

# Influência da esterificação de polifenóis na sua localização em lipossomas

**Bárbara Margarida Gomes Ferreira**

Mestrado em Química

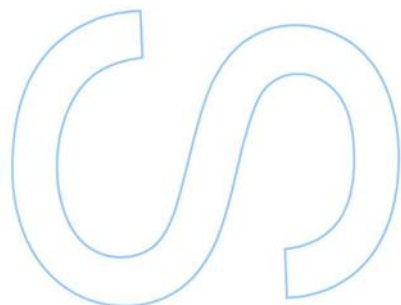
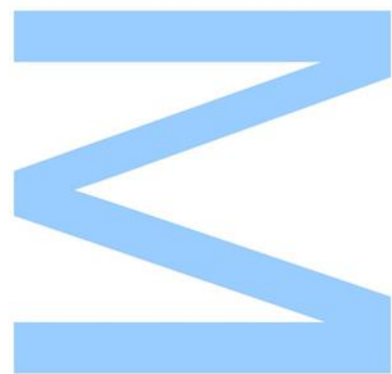
Departamento de Química e Bioquímica da Universidade do Porto  
2016

## **Orientador**

Professora Doutora Paula Gameiro, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

## **Coorientador**

Doutora Sonia Losada-Barreiro, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

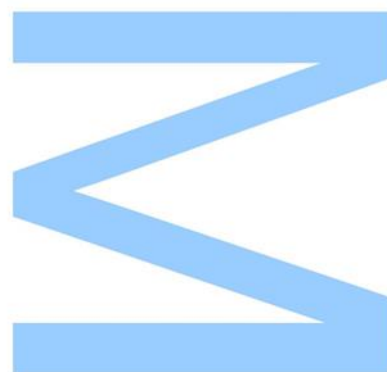




Todas as correções determinadas pelo júri, e só essas, foram efetuadas.

O Presidente do Júri,

Porto, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_



# RESUMO

Os estudos que relacionam os compostos fenólicos com atividade antioxidante com a prevenção de processos resultantes de *stress* oxidativo constituem nos dias de hoje uma promessa para a prevenção de várias patologias, devido à sua capacidade de defender o organismo contra espécies reativas de oxigénio. <sup>[1]</sup>

Um dos principais alvos das espécies reativas de oxigénio são, sem dúvida, as membranas celulares. Deste modo, os compostos que inibem a peroxidação dos fosfolípidos da membrana parecem exercer um efeito protetor em vários eventos patológicos induzidos por radicais de oxigénio. Assim, a localização destes antioxidantes é um fator importante na sua proteção antioxidante; na verdade, o grau de incorporação, a distribuição uniforme nas bicamadas lipídicas e a taxa de transporte em células são fatores fundamentais para que estas moléculas protejam membranas alvo e deste modo possuam eficiência farmacológica. No entanto a maior parte das moléculas antioxidantes de origem natural veem a sua atividade protetora limitada muitas vezes devido à sua baixa lipossolubilidade e estabilidade em tais sistemas membranares. <sup>[2]</sup>

A modificação covalente de antioxidantes polifenólicos através de lipofilização (fenolípidos) é um importante campo de investigação visando o desenvolvimento de antioxidantes com maior eficácia e com possíveis ações benéficas para a saúde do consumidor. Num sistema biológico, a lipofilização poderá contribuir para a mais fácil penetração dos antioxidantes através da bicamada lipídica das membranas celulares, o que poderá aumentar significativamente a sua biodisponibilidade e bioatividade. <sup>[3-4]</sup>

Neste trabalho pretendeu-se proceder a lipofilização de alguns polifenóis de origem natural, nomeadamente do hidroxitirosol (2-(3,4-dihidroxifenil)etanol) e do ácido protocatecuico (ácido 3,4-diidroxibenzóico), e estudar a interação destes derivados mais lipofílicos com as membranas fosfolipídicas, visando encontrar a localização dos compostos dentro da membrana o que poderá conferir ao antioxidante uma maior bioatividade na defesa antioxidante. Para o efeito, sintetizaram-se vários ésteres e estudou-se de que forma o aumento da cadeia alquílica influenciou as interações do antioxidante com a bicamada fosfolipídica de lipossomas de L- $\alpha$ -dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC), utilizados como modelo de membrana biológica. Os rendimentos obtidos para as sínteses situam-se entre 39% e 74% e entre 13% e 35% para os ésteres do hidroxitirosol e do ácido protocatecuico, respetivamente.

De forma a perceber se os compostos seriam estáveis em tampão PBS e se seria possível a sua solubilização, em especial para os ésteres de cadeia alquílica mais

longa, os ésteres do hidroxitirosol foram sujeitos a um estudo de estabilidade por UV-Vis, com exceção dos ésteres C12 e C16 pois estes formavam micelas aquando a preparação de soluções. Verificou-se que ao fim de 60 minutos ocorre uma alteração de cerca de 2% nos valores de absorvância, possivelmente devido à oxidação dos compostos a pH fisiológico. No entanto, o período de tempo necessário para fazer o estudo da localização de antioxidantes é de 15 minutos pelo que podemos considerar o HyTy e os ésteres estáveis obtendo assim resultados precisos e fidedignos.

De modo a determinar a localização dos compostos na membrana, usou-se os métodos de extinção de fluorescência e da anisotropia de fluorescência em estado estacionário, recorrendo-se a duas sondas de fluorescência incorporadas previamente nos lipossomas: a 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH) que se encontra no interior da membrana junto às caudas hidrocarbonadas, e a p-(6-fenil-hexa-1,3,5-trienil)feniltrimetilamónio (TMA-DPH), que se encontra mais perto das cabeças polares dos fosfolípidos. Com estes estudos, pôde-se concluir que à medida que aumentava o número de carbonos na cadeia alquílica dos derivados do HyTy, verificou-se um aumento dos valores de anisotropia para ambas as sondas devido a uma maior penetração dos compostos na bicamada. Para os estudos de extinção de fluorescência, conseguiu-se observar que à medida que aumentava o número de carbonos na cadeia alquílica dos derivados do HyTy e do PCA, verificou-se um aumento dos valores de extinção de fluorescência até ao seu derivado C8. O aumento da cadeia alquílica dos ésteres a partir do derivado C12, nas concentrações utilizadas, alterou a integridade dos lipossomas, o que poderá estar na base do efeito *cut-off* observado em estudos com series de fenolipidos em sistemas biológicos.

**Palavras-chave:** Antioxidantes, Hidroxitirosol, Ácido Protocatecuico, UV-Vis, Lipossomas, Anisotropia, Extinção de Fluorescência, DPH, TMA-DPH

# ABSTRACT

The ability to defend the body against reactive oxygen species enabled by the antioxidant activity of phenolic compounds with antioxidant activity lead to the prevention of processes resulting from oxidative stress and will eventually play an important role on prevention of various diseases. <sup>[1]</sup>

The cell membranes are one of the main targets of the reactive oxygen species. Thus, various pathological events, induced by oxygen radicals, benefit from the protective effect of the compounds which inhibit the peroxidation of phospholipids of the membrane. The location of these antioxidants is an important factor in one's antioxidant protection. In fact, the degree of incorporation, the uniform distribution on the lipid bilayer and the transport rate in cells are fundamental factors for these molecules protect target membranes leading to pharmacological efficiency. However the protective activity of the natural antioxidant molecules is often limited due to its low lipid solubility and stability in the membrane. <sup>[2]</sup>

As covalent modification of polyphenolic antioxidants through lipophilization is an important field of research aim at the development of antioxidants with greater efficiency, their action can contribute to an easier penetration of antioxidants through the lipid bilayer of cell membranes, which can significantly increase its bioavailability and bioactivity. <sup>[3-4]</sup>

This work was intended to carry out the lipophilization of some natural polyphenols, including hydroxytyrosol (2-(3,4-dihydroxyphenyl) ethanol) and protocatechuic acid (3,4-dihydroxybenzoic acid), in order to study the interaction of certain lipophilic derivatives with phospholipid membranes, to find the location of the compounds inside the membrane that can give the antioxidant greater bioactivity in the antioxidant defense. With this purpose, various esters were synthesized and studied, to ascertain how the increase of alkyl chain length influenced antioxidant interactions with the phospholipid bilayer of liposomes of L- $\alpha$ -dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC), used as a model for biological membrane. The yields obtained for the syntheses are between 39% and 74% and between 13% and 35% for the hydroxytyrosol and protocatechuic acid esters, respectively.

In order to understand if the compounds would be stable in PBS buffer and if their solubilization would be possible, especially for the longer alkyl esters, the esters of the hydroxytyrosol were subjected to a UV-Vis stability study, with the exception of the C12 and C16 esters as they formed micelles when preparing solutions. It has been found that

at the end of 60 minutes a change of about 2% occurs in the absorbance values, possibly due to the oxidation of the compounds at physiological pH. However, the time required to study the location of antioxidants is 15 minutes so we can consider HyTy and esters stable to obtain accurate and reliable results.

In order to determine the location of the compounds in the membrane, we have made use of two methods, namely fluorescence extinction and steady state fluorescence anisotropy, using two fluorescence probes previously incorporated in liposomes: 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH) on the inside of the membrane next to hydrocarbon tails, and the p-(6-phenyl-hexa-1,3,5-trienyl)phenyltrimethylammonium (TMA-DPH) which is closer to the polar heads of phospholipids. With these studies, it could be concluded that as the number of carbons in the alkyl chain of the HyTy derivatives increased, anisotropy values for both probes were increased due to a higher penetration of the compounds into the bilayer. For the fluorescence quenching studies, it was found that as the number of carbons in the alkyl chain of the HyTy and the PCA derivatives increased, the fluorescence quenching values to their C8 derivative were increased. The increase of the alkyl chain of the esters from the C12 derivative, at the concentrations used, altered the integrity of the liposomes, which could be the basis of the cut-off effect observed in studies with phenolipid series in biological systems.

**Keywords:** Antioxidants, Hydroxytryosol, Protocatechuic Acid, UV-Vis, Liposomes, Anisotropy, Fluorescence extinction, DPH, TMA-DPH

# ÍNDICE

Resumo .....	III
Abstract .....	V
Índice .....	VII
Índice de Figuras .....	X
Índice de Tabelas .....	XIII
Lista de Abreviaturas .....	XIV
Capítulo 1: Introdução .....	1
1.1. Antioxidantes .....	2
1.1.1. <i>Stress</i> Oxidativo .....	2
1.1.2. Hidroxitirosol .....	3
1.1.3. Ácido Protocatecuico .....	4
1.1.4. Lipofilização de antioxidantes .....	5
1.2. Sistemas miméticos de membranas biológicas .....	8
1.2.1. Lipossomas .....	8
1.2.2. Classificação de lipossomas .....	10
1.2.3. Preparação de lipossomas .....	11
1.2.4. Métodos de caracterização dos lipossomas .....	13
1.3. Estudo da estabilidade do hidroxitirosol por UV-Visível .....	14
1.4. Estudos de localização de antioxidantes em lipossomas de DMPC .....	16
1.4.1. Sondas de fluorescência .....	16
1.4.2. Anisotropia de fluorescência em estado estacionário .....	17
1.4.3. Extinção de fluorescência .....	18
1.4.4. Previsão da eficácia antioxidante: Efeito “ <i>cut-off</i> ” .....	19
Capítulo 2: Objetivo .....	20
Capítulo 3: Materiais e Metodologias .....	22
3.1. Métodos e reagentes .....	23
3.1.1. Síntese dos ésteres alquílicos derivados do hidroxitirosol .....	24
3.1.1.1. Síntese de derivados do hidroxitirosol de cadeia alquílica curta (C1-C8) .....	24
3.1.1.2. Síntese de derivados do hidroxitirosol de cadeia alquílica longa (C12-C16) .....	25
3.1.2. Síntese dos ésteres alquílicos derivados do ácido protocatecuico -	

3.1.2.1. Síntese de derivados do ácido protocatecuico de cadeia alquílica curta (C1-C4) -----	27
3.1.2.2. Síntese de derivados do ácido protocatecuico de cadeia alquílica longa (C6-C16) -----	27
3.1.2.3. Estudo da estabilidade do hidroxitirosol em PBS por UV-Visível -----	29
3.1.3. Sistemas miméticos de membranas biológicas -----	30
3.1.3.1. Síntese de lipossomas -----	30
3.1.3.2. Caracterização de lipossomas -----	30
3.2. Localização dos antioxidantes em lipossomas de DMPC -----	31
3.2.1. Anisotropia de fluorescência -----	31
3.2.2. Extinção da fluorescência -----	31
3.2.3. Análise estatística -----	31
Capítulo 4: Resultados e Discussão -----	32
4.1. Síntese dos ésteres alquílicos derivados do hidroxitirosol e do ácido protocatecuico -----	33
4.1.1. Síntese dos ésteres alquílicos derivados do hidroxitirosol -----	33
4.1.1.1. Síntese de derivados do hidroxitirosol de cadeia alquílica curta (C1-C8) -----	33
4.1.1.2. Síntese de derivados do hidroxitirosol de cadeia alquílica longa (C12-C16) -----	34
4.1.1.3. Caracterização dos ésteres derivados do hidroxitirosol -	34
4.1.2. Síntese dos ésteres alquílicos derivados do ácido protocatecuico -	37
4.1.2.1. Síntese de derivados do ácido protocatecuico de cadeia alquílica curta (C1-C4) -----	37
4.1.2.2. Síntese de derivados do ácido protocatecuico de cadeia alquílica longa (C6-C16) -----	37
4.1.2.3. Caracterização dos ésteres derivados do ácido protocatecuico -----	38
4.2. Estudo da estabilidade do hidroxitirosol por UV-Visível -----	41
4.3. Caracterização dos sistemas miméticos de membranas biológicas -----	44
4.3.1. Caracterização de lipossomas de DMPC -----	44
4.4. Localização dos antioxidantes em lipossomas de DMPC -----	44
4.4.1. Anisotropia de fluorescência em estado estacionário -----	45
4.4.2. Extinção de fluorescência -----	47



4.4.2.1. Extinção de fluorescência na presença de hidroxitirosol e dos seus ésteres alquílicos -----	47
4.4.2.2. Extinção de fluorescência no ácido protocatecuico -----	50
Capítulo 5: Conclusões -----	53
Capítulo 6: Referências bibliográficas -----	56

# ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1-1:</b> Representação esquemática da eliminação dos radicais livres de oxigénio por ação dos antioxidantes. ....	3
<b>Figura 1-2:</b> Estruturas do hidroxitirosol e da oleuropeína. ....	4
<b>Figura 1-3:</b> Estruturas do ácido protocatecuico e da epinefrina. ....	5
<b>Figura 1-4:</b> Representação esquemática da organização estrutural de um lipossoma. -	9
<b>Figura 1-5:</b> Representação esquemática da organização estrutural apresentada pelas cadeias hidrocarbonadas dos fosfolípidos no estado de gel-sólido e de cristal-líquido. $\Delta T$ corresponde à variação de temperatura. ....	9
<b>Figura 1-6:</b> Estrutura de dois tipos de lípidos: (a) 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina (DPPC); (b) 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina (DMPC). ....	10
<b>Figura 1-7:</b> Representação esquemática dos vários tipos de lipossomas classificados de acordo com o tamanho e número de bicamadas lipídicas. Cada linha representada uma bicamada lipídica. ....	11
<b>Figura 1-8:</b> Representação esquemática da preparação de MLV's pelo método de hidratação do filme lipídico. 1) Dissolução dos lípidos num solvente orgânico adequado; 2) Formação do filme lipídico nas paredes do balão, por evaporação do solvente orgânico; 3) Hidratação do filme por adição de solução aquosa; 4) Agitação e obtenção de MLV's; 5) SUV's ou LUV's obtidas por sonicação ou extrusão. ....	12
<b>Figura 1-9:</b> Espectro eletromagnético. ....	14
<b>Figura 1-10:</b> Fórmulas de estrutura das sondas (a) DPH e (b) TMA-DPH. ....	16
<b>Figura 1-11:</b> Representação gráfica da localização das sondas DPH e TMA-DPH numa membrana. ....	17
<b>Figura 2-1:</b> Estruturas químicas dos (a) ésteres de hidroxitirosol e dos (b) ésteres do ácido protocatecuico. ....	21
<b>Figura 3-1:</b> Síntese dos ésteres derivados de hidroxitirosol de cadeia alquílica curta (C1-C8) a partir de hidroxitirosol e ácido (C2, C4, C6, C8). ( $R = (CH_2)_{n-1}CH_3$ , $n = 1, 3, 5, 7$ .) -	24
<b>Figura 3-2:</b> Formação de um éster metílico a partir do ácido (C12, C16) na presença de $BF_3 \cdot CH_3OH$ em metanol. ( $R = (CH_2)_nCH_3$ , $n = 6, 8, 10, 14$ .) ....	25
<b>Figura 3-3:</b> Síntese dos ésteres de hidroxitirosol de cadeia alquílica longa a partir de hidroxitirosol e éster metílico (C12, C16). ( $R = (CH_2)_{n-1}CH_3$ , $n = 7, 11, 15$ .) ....	26

<b>Figura 3-4:</b> Síntese dos ésteres de ácido protocatecuico de cadeia alquílica curta a partir de ácido protocatecuico e álcool (C2, C4) na presença de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> . (R = (CH <sub>2</sub> ) <sub>n-1</sub> CH <sub>3</sub> , n = 2, 4.) -----	28
<b>Figura 3-5:</b> Síntese dos ésteres de ácido protocatecuico de cadeia alquílica longa a partir de ácido protocatecuico e álcool (C6, C8, C12, C16) na presença do catalisador p-TsOH. (R = (CH <sub>2</sub> ) <sub>n-1</sub> CH <sub>3</sub> , n = 6, 8, 12, 16.) -----	42
<b>Figura 4-1:</b> Esquema numerado para a interpretação dos espectros de NMR para os ésteres sintetizados. -----	35
<b>Figura 4-2:</b> Esquema numerado para a interpretação dos espectros de NMR para os ésteres sintetizados. -----	38
<b>Figura 4-3:</b> Representação gráfica do espectro de UV-Vis do hidroxitirosol 3,003x10 <sup>-4</sup> M dissolvido em PBS durante 5 horas. (a) Imagem ampliada dos primeiros 60 minutos. (Legenda: tempo em minutos de medição da absorvância em função do comprimento de onda.) -----	41
<b>Figura 4-4:</b> Representação gráfica do espectro de UV-Vis do etanoato de hidroxitirosilo 3,008x10 <sup>-4</sup> M dissolvido em PBS durante 5 horas. (b) Imagem ampliada dos primeiros 60 minutos. (Legenda: tempo em minutos de medição da absorvância em função do comprimento de onda.) -----	42
<b>Figura 4-5:</b> Representação gráfica do espectro de UV-Vis do butanoato de hidroxitirosilo 3,000x10 <sup>-4</sup> M dissolvido em PBS durante 5 horas. (c) Imagem ampliada dos primeiros 60 minutos. (Legenda: tempo em minutos de medição da absorvância em função do comprimento de onda.) -----	42
<b>Figura 4-6:</b> Representação gráfica do espectro de UV-Vis do hexanoato de hidroxitirosilo 2,992x10 <sup>-4</sup> M dissolvido em PBS durante 5 horas. (d) Imagem ampliada dos primeiros 60 minutos. (Legenda: tempo em minutos de medição da absorvância em função do comprimento de onda.) -----	43
<b>Figura 4-7:</b> Representação gráfica do espectro de UV-Vis do octanoato de hidroxitirosilo 2,995x10 <sup>-4</sup> M dissolvido em PBS durante 5 horas. (e) Imagem ampliada dos primeiros 60 minutos. (Legenda: tempo em minutos de medição da absorvância em função do comprimento de onda.) -----	43
<b>Figura 4-8:</b> Valores de anisotropia da sonda DPH incorporada em lipossomas de DMPC (1mM), juntamente com 100 µM de antioxidante, a 37° C. (barras de erro representam o erro padrão; letras iguais correspondem a valores estatisticamente iguais). DMPC c/DPH 1mM c/[AO] 100 µM ([AO] = HyTy, HyTy-C2, HyTy-C4, HyTy-C6, HyTy-C8, HyTy-C12, HyTy-C16) -----	46
<b>Figura 4-9:</b> Valores de anisotropia da sonda TMA-DPH incorporada em lipossomas de DMPC (1mM), juntamente com 100 µM de antioxidante, a 37° C. (barras de erro	

representam o erro padrão; letras iguais correspondem a valores estatisticamente iguais). DMPC c/TMA-DPH 1mM c/[AO] 100  $\mu$ M ([AO] = HyTy, HyTy-C2, HyTy-C4, HyTy-C6, HyTy-C8, HyTy-C12, HyTy-C16) ----- 46

**Figura 4-10:** Valores da variação de fluorescência da sonda DPH incorporada em lipossomas de DMPC (1mM) numa proporção sonda/lípido de 1:300 e após adição de antioxidante 100  $\mu$ M, a 37° C. (barras de erro representam o erro padrão; letras iguais correspondem a valores estatisticamente iguais). ----- 48

**Figura 4-11:** Valores da variação de fluorescência da sonda TMA-DPH incorporada em lipossomas de DMPC (1mM) numa proporção sonda/lípido de 1:300 e após adição de antioxidante 100  $\mu$ M, a 37° C. (barras de erro representam o erro padrão; letras iguais correspondem a valores estatisticamente iguais). ----- 48

**Figura 4-12:** Valores da variação de fluorescência da sonda DPH incorporada em lipossomas de DMPC (1mM) numa proporção sonda/lípido de 1:300 e após adição de antioxidante (100  $\mu$ M), a 37° C. (barras de erro representam o erro padrão; letras iguais correspondem a valores estatisticamente iguais). ----- 51

# ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 3-1:</b> Dados relativos ao grupo R e tempos de reação para os diferentes ésteres de cadeia alquílica curta do hidroxitirosol. -----	25
<b>Tabela 3-2:</b> Dados relativos ao grupo R e tempos de reação para os diferentes ésteres de cadeia alquílica longa do hidroxitirosol. -----	26
<b>Tabela 3-3:</b> Dados relativos ao grupo R e tempos de reação para os diferentes ésteres de cadeia alquílica longa do ácido protocatecuico. -----	28
<b>Tabela 3-4:</b> Dados relativos aos tempos de agitação para os diferentes ésteres de cadeia alquílica curta do hidroxitirosol. -----	29
<b>Tabela 4-1:</b> Resultados experimentais dos tempos de reação e dos rendimentos obtidos para a obtenção dos ésteres de cadeia alquílica curta de hidroxitirosol por esterificação enzimática. -----	33
<b>Tabela 4-2:</b> Resultados experimentais dos tempos de reação e dos rendimentos obtidos para a obtenção dos ésteres de cadeia alquílica longa de hidroxitirosol por transesterificação enzimática. -----	34
<b>Tabela 4-3:</b> Resultados experimentais dos tempos de reação e dos rendimentos obtidos para a obtenção dos ésteres de cadeia alquílica curta de ácido protocatecuico por esterificação. -----	37
<b>Tabela 4-4:</b> Resultados experimentais dos tempos de reação e dos rendimentos obtidos para a obtenção dos ésteres de cadeia alquílica longa de ácido protocatecuico por esterificação. -----	38
<b>Tabela 4-5:</b> Valores de anisotropia do hidroxitirosol e dos seus ésteres utilizando as sondas DPH e TMA-DPH incorporadas em lipossomas de DMPC (1mM), juntamente com 100 $\mu$ M de antioxidante, a 37° C. -----	45
<b>Tabela 4-6:</b> Caracterização das soluções de DMPC c/DPH ou TMA-DPH (1mM) com os ésteres HyTy-C12 (100 $\mu$ M) e HyTy-C16 (100 $\mu$ M) após estudo da extinção da fluorescência por espectroscopia de correlação fotónica (DLS). -----	50

# LISTA DE ABREVIATURAS

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico

**DLS:** Espectroscopia de correlação fotónica ("*dynamic light scattering*")

**DMPC:** 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina ou L- $\alpha$ -dimiristoilfosfatidilcolina

**DMSO:** Dimetilsulfóxido

**DPH:** 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno

**DPPC:** 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina

**GOV:** Vesículas oligolamelares gigantes

**GUV:** Vesículas unilamerales gigantes

**HyTy:** Hidroxitirosol

**HyTy-C2:** Etanoato de hidroxitirosilo

**HyTy-C4:** Butanoato de hidroxitirosilo

**HyTy-C6:** Hexanoato de hidroxitirosilo

**HyTy-C8:** Octanoato de hidroxitirosilo

**HyTy-C12:** Dodecanoato de hidroxitirosilo

**HyTy-C16:** Hexadecanoato de hidroxitirosilo

**IUV:** Vesículas unilamerales intermédias

**LDL:** Lipoproteína de baixa densidade

**LOV:** Vesículas oligolamelares grandes

**LUV:** Vesículas unilamerales grandes

**MLV:** Vesículas multilamelares

**MVL:** Vesículas multivesiculares

**OLV:** Vesículas oligolamelares

**PBS:** Tampão fosfato-salino

**PCA:** Ácido protocatecuico

**PCA-C2:** Protocatecuato de etilo

**PCA-C4:** Protocatecuato de butilo

**PCA-C6:** Protocatecuato de hexilo

**PCA-C8:** Protocatecuato de octilo

**PCA-C12:** Protocatecuato de dodecilo

**PCA-C16:** Protocatecuato de hexadecilo

**p-TsOH:** Ácido p-toluenossulfónico

**SOV:** Vesículas oligolamelares pequenas

**SUV:** Vesículas unilamerales pequenas

**T<sub>m</sub>:** Temperatura de transição de fase

**TMA-DPH:** p-(6-fenil-hexa-1,3,5-trienil)feniltrimetilamónio

**UV-Vis:** Ultravioleta-Visível

**<sup>1</sup>H-RMN:** Ressonância Magnética Nuclear de Protão

**<sup>13</sup>C-RMN:** Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13

# **CAPITULO 1: INTRODUÇÃO**



## 1.1. ANTIOXIDANTES

Os antioxidantes são substâncias que são capazes de evitar ou retardar a oxidação dos lípidos, proteínas, ADN e proteger os tecidos de danos provocados por radicais livres derivados do *stress* oxidativo, reduzindo assim o risco de surgirem diversas doenças crónico-degenerativas.

A menor incidência de doenças cardíacas coronárias e de alguns tipos de cancro na área do Mediterrâneo levou à hipótese de que uma dieta rica em frutas, legumes e grãos tem um efeito benéfico sobre a saúde. <sup>[1]</sup> Nesta perspetiva, o consumo de antioxidantes naturais pode apresentar para a saúde uma extrema importância. Na verdade, acredita-se que o consumo de azeite, considerado a principal componente de gordura da “dieta mediterrânea”, pode reduzir os danos oxidativos, por um lado, devido à sua riqueza em ácido oleico e, por outro lado, devido aos seus componentes menores, particularmente os compostos fenólicos. <sup>[2]</sup>

Os compostos fenólicos são um complexo grupo de compostos bioativos, amplamente difundido no reino vegetal. Hoje em dia acredita-se que estes compostos estão envolvidos no processo de defesa contra danos oxidativos, pelo menos em parte, devido às suas propriedades antioxidantes. <sup>[3]</sup> Podem apresentar várias atividades biológicas específicas, afetando a expressão genética, sinalização celular, adesão celular, resultando em atividade antibacteriana, anti-inflamatória, antialérgica, anti-trombótica, anticancerígena, antiviral e vasodilatadora. <sup>[4]</sup>

### 1.1.1. *Stress* Oxidativo

Reações de oxidação ocorrem em organismos vivos, bem como na comida. Para o homem, a oxidação é um processo metabólico, fornecendo energia para as células vivas. No entanto, este processo leva a um aumento simultâneo dos radicais livres (ROO $\cdot$ ) sendo que um dos principais alvos destes radicais são, sem dúvida, as bicamadas fosfolipídicas das membranas celulares e subcelulares, pelo que podem dar início a diferentes doenças, tais como cancro ou doenças cardíacas, por meio de danos na membrana celular, na modificação das lipoproteínas LDL, mudança na função plaquetária e mutações de ADN. Assim, do ponto de vista nutricional e tecnológico é desejável o controlo dos processos de oxidação por adição de substâncias inibidoras. <sup>[5]</sup>

Os antioxidantes têm como função anular a ação dos radicais livres, convertendo-os em produtos mais estáveis e/ou inertes, figura 1-1. Estes são anulados

através da transferência de um hidrogénio dos antioxidantes, sendo assim possível controlar a quantidade de radicais livres ou converte-los em resíduos inofensivos podendo exercer um efeito protetor na prevenção de eventos patológicos induzidos pelos mesmos. No entanto, a localização de antioxidantes é um fator importante uma vez que muitas das reações de oxidação em células ocorrem ao nível dos ácidos gordos da membrana. Deste modo, a localização do antioxidante junto destes ácidos poderá ser benéfico para a defesa antioxidante; na verdade, o grau de incorporação e a distribuição uniforme dos antioxidantes nas bicamadas e a taxa de transporte em células são fatores dominantes na eficiência de compostos antioxidantes. [6]

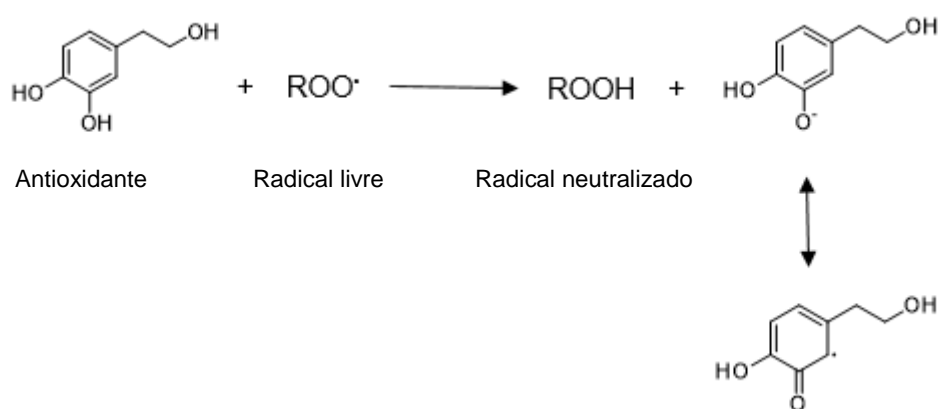


Figura 1-1: Representação esquemática da eliminação dos radicais livres de oxigénio por ação dos antioxidantes.

### 1.1.2. Hidroxitirosol

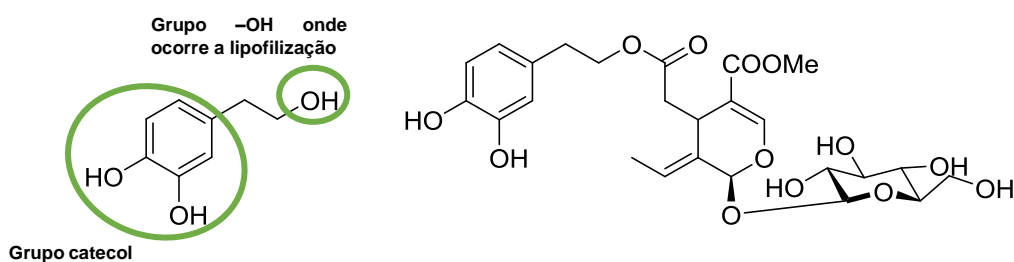
O hidroxitirosol (HyTy), figura 1-2, também conhecido como 3,4-dihidroxitirosol ou (2-(3,4-dihidroxifenil)etanol), é um composto orto-difenólico, metabolito da oleuropeína. É um antioxidante hidrofílico que pode ser encontrado em azeitonas, azeite e folhas de oliveira. É considerado um antioxidante poderoso devido à sua elevada capacidade de neutralização de radicais livres. Tem-se demonstrado que o hidroxitirosol possui várias propriedades biológicas, despertando assim, o interesse deste antioxidante no que diz respeito à sua aplicabilidade farmacoterapêutica num vasto leque de patologias. [20]

Este ácido tem presentes dois grupos importantes na sua constituição:

- O grupo catecol, importante na atividade antioxidante, através da doação de hidrogénio e formação de quinonas.

- O grupo –OH da cadeia alifática, que será o ponto onde se modificará a lipossolubilidade da molécula, convertendo o álcool polar num respetivo éster mais apolar.

A atividade antioxidante é a propriedade mais estudada dos compostos fenólicos. As espécies reativas de oxigénio provenientes do *stress* oxidativo podem causar oxidação e dano celular em macrocélulas, e assim, contribuir para o desenvolvimento de doenças degenerativas, como a aterosclerose, cancro, diabetes, artrite reumatoide e outras doenças inflamatórias. A elevada eficiência antioxidante do HyTy possibilita a eliminação dos radicais livres durante os processos oxidativos, através da doação de radicais hidrogénio do HyTy. Assim, o HyTy exerce efeitos preventivos na oxidação das lipoproteínas de baixa densidade, LDL, fundamental na prevenção do desenvolvimento da aterosclerose, bem como na inibição da proliferação celular de linhas humanas cancerígenas através da cessação do ciclo celular e na indução de apoptose. <sup>[21]</sup> Exerce ainda propriedades antimicrobianas, antiagregantes, vasodilatadoras, hipotensivas e hipoglicémicas. <sup>[20]</sup>



### 1.1.3. Ácido Protocatecuico

O ácido protocatecuico (PCA), figura 1-3, também conhecido como ácido 3,4-diidroxibenzóico é um ácido fenólico, metabolito da epinefrina e pode ser encontrado em algumas plantas e alguns frutos.

Este ácido tem presentes dois grupos importantes na sua constituição:

- O grupo catecol, importante na atividade antioxidante, através da doação de hidrogénio e consequente formação de quinonas.
- O grupo carboxilo, que será o ponto onde se modificará a lipossolubilidade da molécula, convertendo o ácido carboxílico polar num respetivo éster menos polar.

O ácido protocatecuico tem vindo a ser amplamente estudado devido à sua possível atividade antioxidante, antibacteriana, anticancerígena, antidiabética, antiviral, analgésica, cardíaca e anti-inflamatória. [22] A sua capacidade de captação de radicais livres permite também a inibição de proliferação de células cancerígenas.

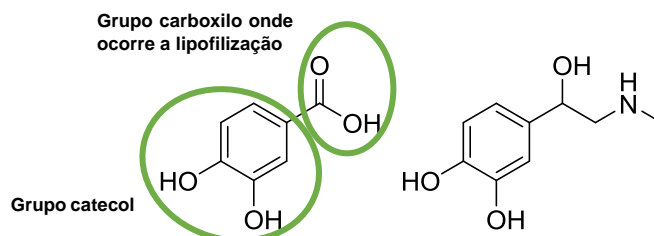


Figura 1-3: Estruturas do ácido protocatecuico e da epinefrina.

#### 1.1.4. Lipofilização de antioxidantes

Compostos fenólicos (especialmente ácidos fenólicos e flavonóides) são potentes antioxidantes que podem desempenhar um papel importante a nível fisiológico (para evitar alguns fatores de risco associados com cancro, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas). No entanto, a sua atividade é muitas vezes limitada pela baixa solubilidade e estabilidade em sistemas biológicos.

As chamadas "reações de lipofilização" podem ser uma estratégia promissora para modular a hidrofobicidade (carácter hidrofílico-lipofílico (HLB)) e a atividade resultante da molécula. A lipofilização pode ocorrer através de reações diferentes, tais como, a esterificação ou a transesterificação. Estas reações ocorrem com recurso à catálise sendo que esta pode ser química ou enzimática. Os catalisadores utilizados nas reações de lipofilização podem homogéneos ou heterogéneos. A escolha do tipo de catálise e de catalisador a serem utilizados nas reações de lipofilização depende da estrutura e a reatividade das moléculas a modificar. [4]

A esterificação química é geralmente realizada em condições drásticas de temperatura e pH de forma a melhorar o rendimento e a velocidade de reação. Para os ácidos fenólicos, a reação é realizada com catalisadores fortemente ácidos, sendo que estes podem ser homogéneos ou heterogéneos. Os catalisadores homogéneos utilizados durante a reação de esterificação podem ser o ácido clorídrico, o ácido sulfúrico ou o ácido p-toluenossulfónico (p-TsOH), enquanto as resinas sulfónicas podem ser utilizadas como bons catalisadores heterogéneos. Apesar de ser rápida e simples, a esterificação não é completa e não seletiva, envolvendo muitas etapas de purificação para remover reagentes em excesso, produtos secundários e catalisador.

Em contraste, a síntese enzimática é altamente seletiva e é considerado um processo mais ambientalmente amigável, uma vez que envolve condições de reação mais suaves, nomeadamente menos etapas de purificação e menor produção de resíduos. No entanto, vale a pena manter em mente que os processos enzimáticos são frequentemente associados fatores negativos, tais como, a tempos de reação mais longos, custos mais elevados de catalisador e a problemas de inibição/desativação da enzima, estando estes fatores relacionados com as condições de reação (natureza dos substratos, produtos e solventes, pH, estado de hidratação de enzima, etc.).

Finalmente, uma estratégia intermédia de lipofilização quimio-enzimática, pode ser alcançada em duas etapas sob condições livres de solventes. Consiste na conversão química do ácido fenólico no seu éster metílico correspondente, seguido por transesterificação catalisada por enzima com álcool gordo para dar o fenolípido desejado. Comparando com a esterificação direta na ausência/presença de solventes, esta estratégia permite maior rendimento global e tempos de reação mais curtos através da combinação de dois fatores. Em primeiro lugar, o éster metílico do ácido fenólico é muito mais solúvel em álcoois gordos (especialmente os de cadeia longa) do que seu precursor não-esterificado, contribuindo assim para um melhor contacto entre substratos e enzimas. Em segundo lugar, o metanol libertado durante a transesterificação pode ser removido do meio através da evaporação, após purificação, que promove a reação no sentido direto.<sup>[4]</sup>

A lipofilização de compostos fenólicos pode aumentar a sua solubilidade em matrizes lipofílicas, conferindo melhor proteção antioxidante. Num sistema biológico, a lipofilização poderá contribuir para uma mais fácil penetração de antioxidantes através da bicamada lipídica das membranas celulares, o que poderá aumentar significativamente a sua biodisponibilidade e a sua eficiência protetora contra as espécies reativas de oxigénio (ROS) lançadas pela mitocôndria para o citosol. Por outro lado, o modular da hidrofobicidade de antioxidantes através da lipofilização também é benéfico para a sua utilização em sistemas de distribuição de fármacos, melhorando a solubilidade do antioxidante e a incorporação em transportadores lipídicos como micelas, emulsões ou lipossomas.<sup>[7]</sup>

No entanto, a força lipofílica tem de ser ajustada, uma vez que um aumento acentuado da hidrofobicidade do antioxidante pode resultar numa atividade antioxidante não ideal. A relação entre a hidrofobicidade e atividade antioxidante segue uma tendência de parabólica, ou seja, a atividade antioxidante aumenta com o aumento da cadeia alquílica do antioxidante até um certo ponto crítico, após o qual diminui a sua atividade. Assim sendo, verifica-se que a atividade biológica não se correlaciona

diretamente com a hidrofobicidade da molécula. Este fenómeno é denominado de efeito “*cut-off*”.

## 1.2. SISTEMAS MIMÉTICOS DE MEMBRANAS BIOLÓGICAS

### 1.2.1. Lipossomas

Os lipossomas, devido à sua composição e organização, constituem modelos membranares preciosos para o estudo da interação dos fármacos com as membranas. A partir da informação retirada com estes sistemas teremos uma melhor percepção dos fenómenos envolvidos nos sistemas de maior complexidade, como células ou tecidos. A utilização de lipossomas como modelos membranares advém do facto de poderem ser preparados a partir de constituintes naturais e de apresentarem uma estrutura idêntica à porção lipídica das biomembranas. De modo a tornar o seu estudo possível, diferentes sistemas modelo de membranas têm sido desenvolvidos. As membranas modelo mais simples que se podem estudar são compostas apenas por um único tipo de lípidos.

Os lipossomas, ou vesículas lipídicas, são estruturas esféricas fechadas, constituídas por fosfolípidos anfipáticos, os quais são caracterizados por possuírem um grupo hidrofílico ligado a duas cadeias hidrofóbicas, podendo também incluir outros componentes membranares, como o colesterol. Os lípidos anfipáticos, também denominados anfifílicos, possuem a capacidade de espontaneamente formar agregados em bicamada quando dispersos em solução aquosa, envolvendo no seu interior um determinado volume do solvente. Estas estruturas fechadas podem ser constituídas por uma ou várias membranas concêntricas.

A investigação realizada com lipossomas tem vindo a expandir-se, após a sua descoberta por Alec Bangham<sup>[17]</sup>, tendo-se centrado inicialmente na sua utilização como modelos membranares em várias áreas como a farmacêutica, medicina e bioquímica, nas quais, ainda hoje, ocupam lugar de grande relevo.

O estudo de lipossomas permite, também, avaliar o comportamento de fármacos nas células. Dependendo da natureza do fármaco, este pode encontrar-se em diferentes locais membranares quando em contacto com o lipossoma. Assim, em termos de localização, um fármaco poderá atuar com as vesículas lipossómicas a três níveis distintos: Se o fármaco for hidrossolúvel poderá encontrar-se no compartimento aquoso do lipossoma ou na fase aquosa exterior do lipossoma, enquanto se for hidrofóbico, encontrar-se-á na zona apolar das membranas, isto é, na zona lipídica da bicamada.

Porém, se for anfotérico, o fármaco rearranja-se de modo a colocar a sua parte hidrofílica junto aos grupos polares da membrana e a sua parte hidrofóbica junto às cadeias hidrocarbonadas, figura 1-4. [9]

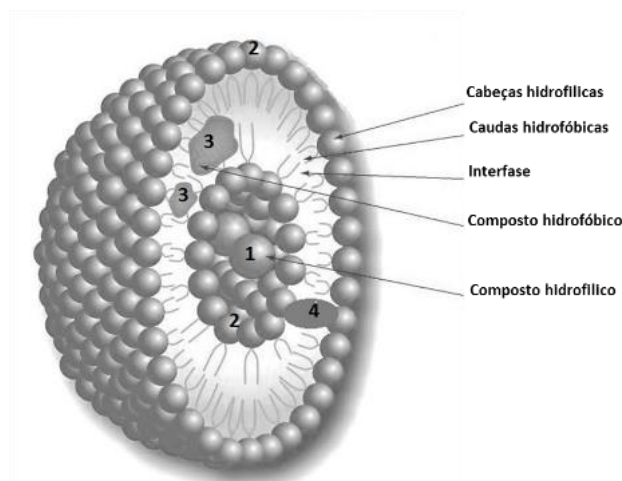


Figura 1-4: Representação esquemática da organização estrutural de um lipossoma.

Uma das principais características físicas das bicamadas lipídicas é a existência de uma determinada temperatura à qual a organização dos fosfolípidos sofre uma alteração. Assim, para diferentes valores de temperatura, as bicamadas lipídicas podem apresentar-se em duas fases termodinamicamente distintas, ocorrendo a transição de uma para a outra fase por variação da temperatura. Deste modo, as bicamadas lipídicas podem apresentar-se numa fase de grande ordenação, designada por estado de gel-sólido e, para temperaturas mais elevadas, numa fase mais fluida denominada de cristal-líquido, como está representado esquematicamente na figura 1.5.

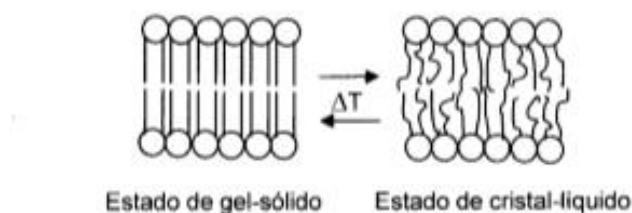


Figura 1-5: Representação esquemática da organização estrutural apresentada pelas cadeias hidrocarbonadas dos fosfolípidos no estado de gel-sólido e de cristal-líquido.  $\Delta T$  corresponde à variação de temperatura.

A temperatura de passagem de uma fase à outra denomina-se temperatura de transição de fase,  $T_m$ , e é específica para um determinado lípido. Deste modo, quando a temperatura do sistema é inferior à  $T_m$  dos fosfolípidos constituintes de uma determinada bicamada, esta apresenta uma estrutura ordenada, em que as cadeias hidrocarbonadas se encontram numa conformação distendida e firmemente



empacotadas, sendo a liberdade de movimentos muito restrita. Acima da  $T_m$ , aumenta consideravelmente a mobilidade das cadeias hidrocarbonadas na membrana, a área ocupada por cada molécula de fosfolípido é superior e a espessura da bicamada diminui. A  $T_m$  dos fosfolípidos depende da natureza do grupo polar, bem como do comprimento e grau de insaturação das cadeias hidrocarbonadas. Lípidos com regiões apolares compostas por duas cadeias saturadas de diferentes tamanhos, por exemplo o 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina (DPPC) (figura 1-6 a), com 16 carbonos, e o 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina (DMPC) (figura 1-6 b), com 14 carbonos, têm temperaturas de transição diferentes, 41° C e 23° C, respectivamente. Geralmente, a  $T_m$  aumenta com o comprimento das cadeias dos ácidos gordos e diminui com o grau de insaturação.<sup>[10]</sup>

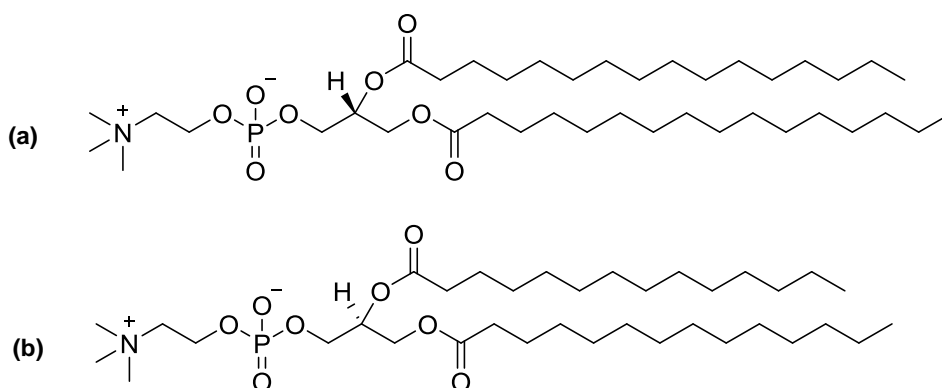


Figura 1-6: Estrutura de dois tipos de lípidos: (a) 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina (DPPC); (b) 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina (DMPC).

Deve-se ainda referir que o lipossoma só é formado quando os lípidos que o constituem são manipulados a uma temperatura superior à respetiva  $T_m$ .<sup>[8]</sup>

### 1.2.2. Classificação de lipossomas

A partir do início da década de 80, foi definitivamente adotada uma nomenclatura para os lipossomas baseada no seu número de bicamadas lipídicas e tamanho. Assim, sem qualquer processamento adicional, a dispersão de fosfolípidos em água origina uma população polidispersa denominada vesículas multilamelares (MLVs - "multilamellar vesicles"), cujos tamanhos estão, geralmente, compreendidos entre 0,4 e 3,5 nm de diâmetro. Cada vesícula consiste em várias bicamadas lipídicas (à volta de

cinco ou mais) dispostas concentricamente, entre as quais se dispõe uma fração do meio aquoso interno. As MLVs foram as usadas nos primeiros estudos e são, então, as de preparação mais imediata. Os lipossomas formados por uma única bicamada são denominados vesículas unilamelares grandes (LUVs - "large unilamellar vesicles") se o seu tamanho for superior a 50 nm segundo alguns autores<sup>[23]</sup> e a 100 nm segundo outros<sup>[22]</sup>. As vesículas unilamelares pequenas (SUVs - "small unilamellar vesicles") são caracterizadas por diâmetros aproximados de 25 a 50 nm e as vesículas unilamelares de tamanho intermédio (IUVs - "intermediate-sized unilamellar vesicles") por tamanhos intermédios. Para além destas vesículas unilamelares, devem-se ainda considerar as vesículas unilamelares gigantes (GUVs - "giant unilamellar vesicles"), com dimensões superiores a 1  $\mu\text{m}$ , podendo chegar às dezenas de  $\mu\text{m}$ , tamanho comparável ao de uma célula eucariota (entre 10 a 100  $\mu\text{m}$  de diâmetro). Existem ainda outros tipos de lipossomas, nomeadamente os lipossomas multivesiculares (MVLs - "multivesicular vesicles") e as vesículas oligolamelares (OLVs - "oligolamellar vesicles"), que, à semelhança das vesículas unilamelares, podem ser subdivididas em pequenas, grandes e gigantes (SOV, LOV e GOV) [1]. Na Figura 1-7 estão representados os vários tipos de lipossomas descritos. <sup>[8]</sup>

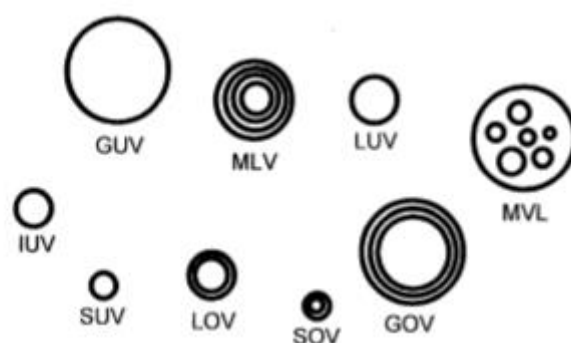


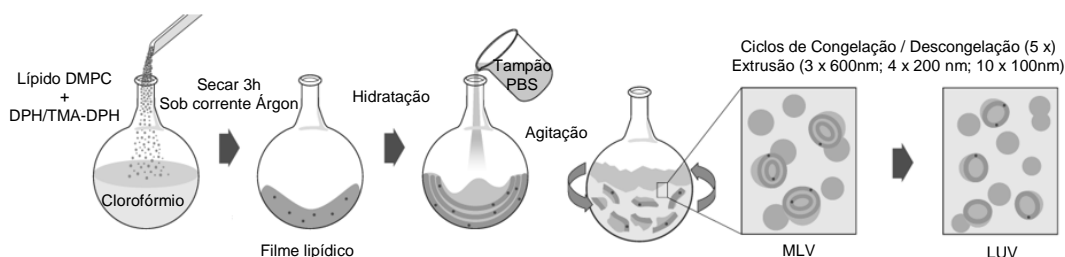
Figura 1-7: Representação esquemática dos vários tipos de lipossomas classificados de acordo com o tamanho e número de bicamadas lipídicas. Cada linha representada uma bicamada lipídica.

### 1.2.3. Preparação de lipossomas

A ampla utilização de lipossomas para os mais diversos fins criou a necessidade de desenvolver métodos preparativos eficientes, reprodutíveis e com a maior simplicidade possível. Os métodos de preparação de lipossomas, atualmente disponíveis, são diversos e podem apresentar numerosas variantes. Além disso, procura-se que os métodos de preparação possibilitem a obtenção de lipossomas a uma escala industrial.

O tipo de lipossoma é, essencialmente, condicionado pelo seu método de preparação. De facto, de acordo com os objetivos do estudo, deve ser selecionado o tipo de lipossoma.

O processo clássico de preparação de lipossomas, iniciado por Alec Bangham<sup>[17]</sup> em 1965, denomina-se método de hidratação do filme lipídico. Neste método, uma fina e homogênea camada lipídica é depositada nas paredes de um balão de vidro por evaporação à secura, em vácuo ou sob corrente de gás inerte, de uma solução do lípido num solvente ou mistura de solventes orgânicos, os quais sejam, simultaneamente, eficientes na dissolução do lípido e suficientemente voláteis, como por exemplo, clorofórmio e clorofórmio-metanol. O filme lipídico preparado é posteriormente hidratado com uma solução aquosa. A agitação da mistura conduz à formação espontânea de uma população de vesículas lipossômicas heterogênea no que respeita ao tamanho e número de bicamadas lipídicas. Os lipossomas assim preparados são denominados de lipossomas multilamelares de diferentes tamanhos e número de camadas lipídicas que podem ser, posteriormente, tratadas de forma a obter populações mais homogêneas e de tamanho definido. A figura 1-8 apresenta os principais passos deste método. <sup>[8-9]</sup>



**Figura 1-8: Representação esquemática da preparação de MLV's pelo método de hidratação do filme lipídico. 1) Dissolução dos lipídios num solvente orgânico adequado; 2) Formação do filme lipídico nas paredes do balão, por evaporação do solvente orgânico; 3) Hidratação do filme por adição de solução aquosa; 4) Agitação e obtenção de MLV's; 5) SUV's ou LUV's obtidas por sonicação ou extrusão.**

Quando se pretende obter vesículas homogêneas e de tamanho bem definido, torna-se necessário submeter as MLVs a processamentos adicionais. Estes processamentos conduzem à obtenção de lipossomas unilamelares, e incluem métodos mecânicos, químicos ou eletrostáticos. Destes tratamentos, o mais utilizado para a obtenção de populações mais homogêneas e de tamanho definido são os meios mecânicos, mais especificamente, a extrusão através de filtros de tamanho de poro fixo ou a sonicação. Ciclos de congelamento/descongelamento também podem ser utilizados na obtenção de populações de lipossomas homogêneas uma vez que permitem aumentar o volume interno aquoso dos lipossomas por eliminação das sucessivas camadas de lípido presentes nas MLV's. <sup>[8-9]</sup>

A extrusão baseia-se na passagem forçada das MLV's através de filtros de membranas de policarbonato ou de celulose, de diâmetro de poro bem definido, sob elevadas pressões (aproximadamente 100 atm) de um gás inerte, a uma temperatura superior à temperatura de transição de fase do ou dos lípidos constituintes da suspensão. A repetição da extrusão tende a diminuir o número de bicamadas lipídicas e após aproximadamente 10 extrusões, os lipossomas apresentam-se predominantemente homogêneos e unilamelares. O seu diâmetro final vai depender do tamanho do poro utilizado e das características do próprio lípido. [8-9]

#### **1.2.4. Métodos de caracterização dos lipossomas**

As características físicas e químicas dos lipossomas, tais como o tamanho e sua homogeneidade, número de bicamadas, permeabilidade, estabilidade e eficiência de encapsulação são dependentes do método utilizado na sua preparação, pelo que é importante proceder à caracterização dos lipossomas. Existem diversos métodos para a análise dos lipossomas, os quais podem ser agrupados nas seguintes categorias: microscópicos, espectroscópicos, de difração e correlação fotónica, termodinâmicos, hidrodinâmicos, mecânicos, biológicos, químicos e computacionais. Os mais usados são os de espectroscopia de correlação fotónica ("*dynamic light scattering*" - DLS), os quais fornecem dados relativos ao diâmetro dos lipossomas, a partir de medidas da difusão destes. [8]

### 1.3. ESTUDO DA ESTABILIDADE DO HIDROXITIRO SOL POR UV-VISÍVEL

Para levar a cabo o estudo da localização dos antioxidantes em lipossomas, foi necessário, previamente, realizar uma análise espectrofotométrica da estabilidade do hidroxitirosol em meio de pH fisiológico (PBS), uma vez que este a pHs ácidos é estável, e a pHs básicos sofre um rápido processo de autooxidação.

A espectroscopia ótica consiste no estudo da interação da radiação (na faixa do ultravioleta, visível e infravermelho) com a matéria. Quando a radiação interage com a matéria alguns processos podem ocorrer, incluindo reflexão, espalhamento, absorção, fluorescência e reações químicas. Na espectroscopia, a energia das moléculas pode ser expressa como a soma de três tipos de energias: rotacional, vibracional e eletrónica.

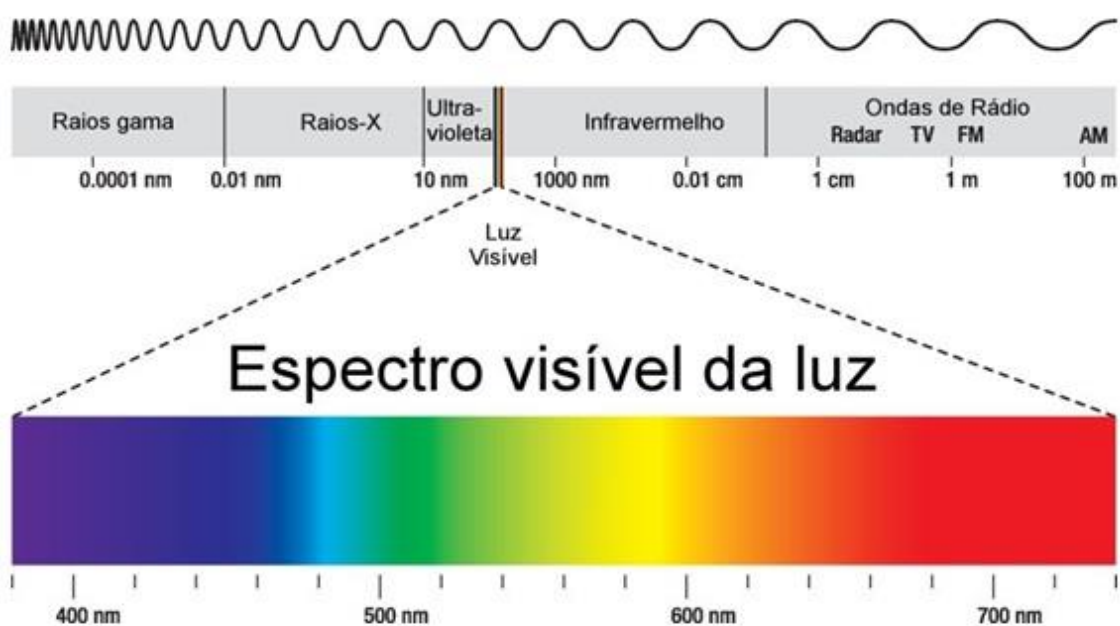


Figura 1-9: Espectro eletromagnético.

A absorção de energia depende da estrutura eletrónica das moléculas, e por isso, a espectroscopia de absorção na região UV-Vis tem ampla aplicação na caracterização de uma série de propriedades de diversas espécies orgânicas e inorgânicas. Esta técnica é muito utilizada na quantificação da concentração de um composto em solução, mas também pode ser utilizada para estudar a cinética da reação de um composto em solução.

A luz visível representa apenas uma banda muito estreita do espectro eletromagnético e considera-se que esta está compreendida entre 380 e 780 nm, figura 1-9. A luz ultravioleta corresponde à região do espectro entre 210 e 380 nm.

O espectro gerado durante uma análise espectrofotométrica resulta num gráfico de absorvância em função do comprimento de onda. A incidência de uma radiação continua (feixe de luz) sobre uma amostra resulta em absorção da radiação, onde átomos e moléculas passam de um estado de energia mais baixa (estado fundamental) para um estado de energia maior (estado excitado). A radiação absorvida é quantificada, ou seja tem um valor igual à diferença de energia entre os estados excitado e fundamental. Como a energia absorvida é quantificada, o espectro de uma única transição eletrónica deveria corresponder a uma linha discreta. Esta previsão não se confirma, uma vez que a absorção eletrónica se sobrepõe a subníveis rotacionais e vibracionais; assim, um espectro de UV-Vis tem o aspeto de uma banda.

Esta técnica baseia-se na Lei de Lambert-Beer em que diz que a absorvância é proporcional à concentração de uma substância em solução. A Lei de Lambert-Beer pode ser expressa da seguinte forma:

$$A = \varepsilon lc \quad \text{Equação (1)}$$

Onde  $A$  indica absorvância,  $\varepsilon$  é a absortividade molar ( $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ),  $c$  é a concentração da solução ( $\text{mol dm}^{-3}$ ) e  $l$  é espessura da célula (1 cm).

## 1.4. ESTUDOS DE LOCALIZAÇÃO DE ANTIOXIDANTES EM LIPOSSOMAS DE DMPC

### 1.4.1. Sondas de fluorescência

A fluorescência emitida por um determinado fluoróforo contém informações relacionadas não só com o fluoróforo, mas também relativas às moléculas que o rodeiam. Desta forma, o fluoróforo quando posicionado em determinado local de interesse e depois de devidamente conhecidas as suas características quanto à emissão de fluorescência, pode ser utilizado na obtenção de informação sobre os fenómenos do meio envolvente, sendo então designado como sonda de fluorescência.

Nos sistemas biológicos existem dois tipos de sondas, as sondas intrínsecas como alguns resíduos de aminoácido presentes em proteínas que apresentam fluorescência ou, sondas extrínsecas, que consistem em moléculas fluorescentes adicionadas aos sistemas não fluorescentes como o caso dos lípidos. As sondas permitem obter uma grande variedade de informações através da análise dos seus espectros de excitação, de emissão, do seu rendimento quântico de fluorescência, do tempo de vida e da polarização. Assim, o conhecimento adequado dos processos de fluorescência permite obter informações sobre a fluidez membranar, a viscosidade e polaridade dos solventes, perturbações membranares, a distância entre cromóforos, entre outras.<sup>[11]</sup>

O DPH (1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno) e o TMA-DPH (p-(6-fenil-hexa-1,3,5-trienil)feniltrimetilamónio) têm vindo a ser das sondas de fluorescência extrínsecas mais utilizadas no estudo da estrutura e propriedades dinâmicas das membranas, figura 1-10. O DPH, sendo uma molécula hidrofóbica, posiciona-se completamente na fase membranar, levando a que a sua fluorescência se verifique apenas na fase membranar e nunca em fase aquosa, figura 1-11.<sup>[9]</sup>

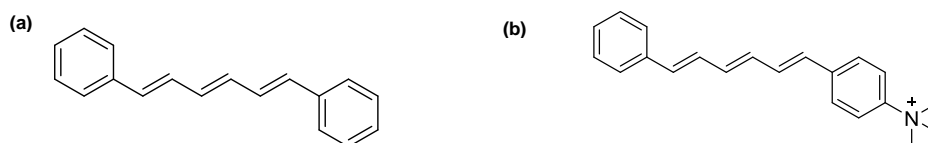


Figura 1-10: Fórmulas de estrutura das sondas (a) DPH e (b) TMA-DPH.

A inserção de um grupo trimetilamônio num dos grupos fenilo da molécula de DPH, figura 1-10, leva a uma menor hidrofobicidade da sonda e esta, quando adicionada a uma membrana, vai localizar-se perto da interface água/membrana. Deste modo, o grupo trimetilamônio encontra-se ligado às cabeças polares das membranas enquanto a “cauda” DPH se encontra alinhada junto das cadeias hidrocarbonadas, figura 1-11.<sup>[9]</sup>

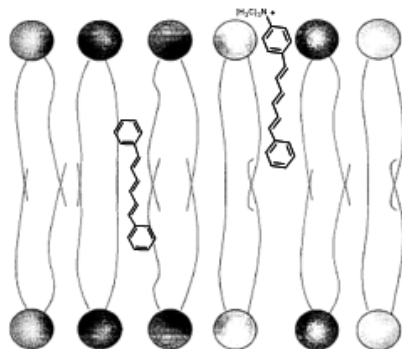


Figura 1-11: Representação gráfica da localização das sondas DPH e TMA-DPH numa membrana.

### 1.4.2. Anisotropia de fluorescência em estado estacionário

A anisotropia de fluorescência permite obter informações sobre vários ambientes membranares desde a sua fluidez a informações sobre tamanho, forma e localização de proteínas sendo, por este motivo, utilizada frequentemente nas aplicações bioquímicas da fluorescência.<sup>[9]</sup>

No estudo da anisotropia de fluorescência, é medida a rotação molecular durante o tempo de vida do estado excitado de uma molécula, sendo por isso sensível à rigidez do meio molecular bem como à forma e tamanho do fluoróforo. Assim, a anisotropia,  $r$ , o parâmetro ajustável da equação (2) é função da microviscosidade do meio em que estão os fluoróforos na fase lipídica, e está diretamente relacionada com as interações com as moléculas existentes na sua vizinhança. Este método revela-se um dos mais indicados para a deteção de alterações membranares decorrentes da inclusão de moléculas externas na sua organização estrutural.<sup>[12]</sup>

$$r = \frac{I_{VV} - GI_{VH}}{I_{VV} + 2GI_{VH}} \quad \text{Equação (2)}$$

Na equação (2),  $I_{VV}$  e  $I_{VH}$  são intensidades de luz medidas paralela e perpendicularmente ao feixe de excitação polarizado na vertical. É ainda necessário considerar outro parâmetro, o fator geométrico também designado por fator  $G$ . O fator



$G$  é um fator instrumental que corresponde à sensibilidade relativa do equipamento à luz polarizada vertical ou à luz polarizada horizontalmente. Este fator é usado para corrigir  $I_{VH}$  no cálculo da anisotropia. <sup>[12]</sup>

### 1.4.3. Extinção de fluorescência

Os estudos de localização membranar efetuados por extinção de fluorescência baseiam-se na diminuição de fluorescência emitida por um fluoróforo, quando este interatua com uma molécula que o rodeia. Assim, o fundamento do método de extinção de fluorescência em estruturas organizadas, como os lipossomas, envolve um fluoróforo solubilizado no interior da estrutura ou adsorvido à sua superfície, cuja fluorescência é desativada pela presença do soluto que pode partilhar entre a fase organizada e o solvente. A velocidade e/ou extensão com que o desactivador penetra na estrutura, bem como a velocidade de difusão até ao fluoróforo, vão determinar a cinética do processo de desativação, sendo que a extensão da extinção de fluorescência é inversamente proporcional à distância entre o fluoróforo e o composto que extingue a fluorescência. <sup>[14]</sup>

A extinção de fluorescência é, então, utilizada como um método indireto para inferir acerca da localização de um desactivador na membrana lipídica, uma vez que se baseia na diminuição da intensidade de fluorescência emitida por uma sonda de fluorescência. No entanto, nos estudos de localização por este método, é necessário o conhecimento mais exato possível da localização das sondas na bicamada, a assunção de que todas as sondas têm a mesma eficácia intrínseca de desativação e a identificação do grupo químico responsável pela desativação. <sup>[15-16]</sup>

Para a desativação de fluorescência se verificar, é necessário que o desactivador esteja localizado na proximidade do fluoróforo para que possa ocorrer interação entre eles.

#### 1.4.4. Previsão da eficácia antioxidante: Efeito “*cut-off*”

O aumento do número de átomos de carbono nas cadeias alquílicas de antioxidantes não só muda o equilíbrio hidrofílico-lipofílico (HLB), mas também afeta as suas solubilidades relativas em óleo, água, e regiões interfaciais de emulsões ou potenciais de oxidação / redução dos antioxidantes.

Investigações recentes<sup>[25-28]</sup> sobre os efeitos do comprimento de cadeia alquílica para várias séries de antioxidantes homólogos mostram que sua eficiência não aumenta linearmente com o aumento do número de átomos de carbono na sua cadeia alquílica mas é do tipo parabólica, com um máximo numa cadeia intermediária (C4-C12), após o qual diminui a sua atividade, sendo este efeito conhecido como efeito “*cut-off*”. Assim sendo, verifica-se que a atividade biológica dos antioxidantes não se correlaciona diretamente com a hidrofobicidade da molécula. Reportado pela primeira vez há mais de um século atrás, agora é frequentemente observado em várias atividades biológicas de quase todas as séries de antioxidantes anfífilos homólogos testados.

A explicação deste fenómeno ainda não foi estudada convenientemente tendo-se levantado algumas hipóteses para este efeito suspeito tais como alteração da cadeia carbonada provoca alteração do equilíbrio hidrofílico-lipofílico (HLB), ou seja, existe uma necessidade de um valor de HLB ótimo, e também alterações na capacidade de auto-agregação dos derivados de cadeia longa com possível formação de micelas que diminui a disponibilidade dos compostos. Além disso, também tem sido adotado que as mudanças induzidas pelos antioxidantes nas propriedades da bicamada lipídica são fatores que contribuem para o efeito “*cut-off*”, visto que estas podem alterar a espessura da bicamada, fazer alterações na separação de fases e mudar a elasticidade de curvatura da bicamada.<sup>[24]</sup> Apesar de tudo, estas hipóteses ainda não foram comprovadas.

## **CAPITULO 2: OBJETIVO**

## 2. OBJETIVO

Recorremos ao uso de antioxidantes fenólicos para atuarem como agentes terapêuticos no combate de doenças associadas com o *stress* oxidativo. Estes antioxidantes normalmente encontram-se presentes em plantas e frutas, sendo que a sua atividade antioxidante vai depender de vários fatores como a temperatura, pH, estrutura do antioxidante e a sua distribuição nos diferentes locais de atuação.

Durante o trajeto das moléculas de antioxidante, desde o local de absorção até aos locais onde a sua ação será exercida, é inevitável a passagem por várias barreiras lipídicas formadas pelas membranas celulares.

O hidroxitirosol e o ácido protocatecuico são antioxidantes de carácter hidrofílico, ou seja, apresentam pouca afinidade pelas biomembranas. Assim, após a síntese de vários ésteres destes antioxidantes, figura 2-1, tencionou-se analisar a localização destes compostos em matrizes lipídicas, de forma a compreender de que forma o tamanho da cadeia alquílica influencia o carácter hidrofílico-hidrofóbico do antioxidante e as interações entre antioxidante e bicamada fosfolipídica de lipossomas.

A realização deste trabalho é importante pois saber o grau de incorporação do antioxidante nas bicamadas lipídicas é um fator fundamental para que estas moléculas protejam membranas alvo das reações de oxidação e deste modo possuam maior eficiência antioxidante e farmacológica. Além disso, permite que no futuro se desenhem novas moléculas com maior eficiência e biodisponibilidade.

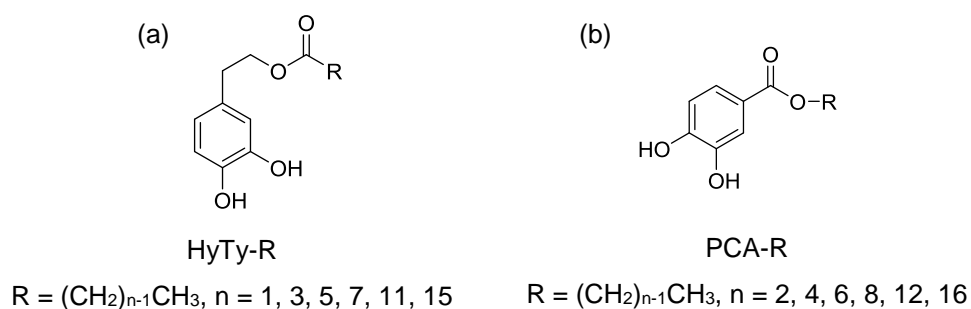


Figura 2-1: Estruturas químicas dos (a) ésteres de hidroxitirosol e dos (b) ésteres do ácido protocatecuico.

## **CAPITULO 3: MATERIAIS E METODOLOGIAS**

### 3.1. Métodos e reagentes

Todos os solventes usados nas sínteses eram de qualidade “Puro” e os usados nas cromatografias em coluna foram de qualidade “Para análise” da Merk, Sigma Aldrich ou da Fluka.

Para a análise dos compostos sintetizados a cromatografia em camada fina (TLC) e a ressonância magnética nuclear de próton ( $^1\text{H}$ -RMN) foram as técnicas utilizadas.

Utilizou-se as placas de gel de sílica em suporte de alumínio (Merk 60 F<sub>254</sub>), tendo estas sido reveladas por luz UV, em câmara de iodo e com solução de Mostain (100 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10%, 5,0 g (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>.4H<sub>2</sub>O, 0,22 g Ce(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O).

Nas purificações por cromatografia em coluna utilizou-se como fase estacionária gel de sílica (0,040-0,063 mm, Merck).

Traçaram-se os espectros de RMN ( $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ ) utilizando acetona deuterada como solvente, num espectrómetro digital de Ressonância Magnética Nuclear a 400MHz (Bruker Avance III 400).

Utilizou-se a solução tampão fosfato salino PBS (pH=7,4, 0,01 M) da Sigma.

Utilizou-se como lípido o L- $\alpha$ -dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) da Avanti, armazenado a -18° C e sem purificação adicional.

Usaram-se as sondas de fluorescência 1,6-difenil-,1,3,5-hexatrieno (DPH) e a p-(6-fenil-hexa-1,3,5-trienil)feniltrimetilamónio (TMA-DPH) da Sigma, dissolvidas em clorofórmio e armazenadas ao abrigo da luz e à temperatura de -20° C.

Os espectros UV/Vis foram traçados em dois espectrofotómetros. Num espectrofotómetro Shimadzu UV-3600, UV-Vis-NIR Spectrophotometer associado a um dispositivo de controlo de temperatura Controller TCC-240A (TCC – *temperature controlled cell holder*) e num espectrofotómetro Thermo Scientific, Evolution 201, UV-Visible Spectrophotometer.

Efetuaram-se os estudos de fluorescência num espectrofotómetro Cary Eclipse da Varian, associado a um dispositivo de controlo de temperatura (“*peltier single cell holder*”).

As pesagens foram feitas numa balança analítica Mettler AT201 ( $\pm 2 \times 10^{-5}$  g) e numa balança analítica Mettler AJ100 ( $\pm 2 \times 10^{-5}$  g).

Para a preparação dos lipossomas unilamelares utilizou-se um extrusor Lipex Biomembranares de 10 mL, e filtros de policarbonato Nucleopore Track-Etch Membrane da Whatman Schleicher & Schuell.

Efetuuou-se a granulometria dos lipossomas por espectroscopia de correlação fotônica num ZetaSizer 5000 da Malvern, equipado com um laser helio-néon de emissão 633 nm, com uma potência de 5 mW.

### 3.1.1. Síntese dos ésteres alquílicos derivados do hidroxitirosol

#### 3.1.1.1. Síntese de derivados do hidroxitirosol de cadeia alquílica curta (C1-C8)

Os ésteres do hidroxitirosol (HyTy) de cadeia alquílica curta (C1-C8) foram obtidos por esterificação do HyTy com ácidos gordos de cadeia linear de diferentes tamanhos (C2, C4, C6 e C8) com catálise enzimática, de acordo com o procedimento descrito por *João et al*, figura 3-1.<sup>[13]</sup>

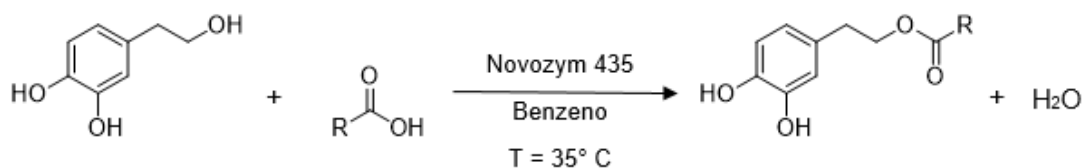


Figura 3-1: Síntese dos ésteres derivados de hidroxitirosol de cadeia alquílica curta (C1-C8) a partir de hidroxitirosol e ácido (C2, C4, C6, C8). (R = (CH<sub>2</sub>)<sub>n-1</sub>CH<sub>3</sub>, n = 1, 3, 5, 7.)

Para um balão de fundo redondo de 100 mL, mediram-se 3,24 mmol de hidroxitirosol e 9,72 mmol do ácido (C2, C4, C6, C8), 0,972 g de enzima Novozym 435 e ≈33 mL de benzeno. Deixou-se a solução a 35°C durante um determinado tempo, de acordo com o tempo indicado na tabela 3-1. Após o tempo de reação, efetuou-se a filtração da enzima e transferiu-se a solução para uma ampola de decantação e adicionaram-se 80 mL de éter etílico. Procedeu-se à lavagem da camada orgânica com três porções de 30 mL de solução aquosa de bicarbonato de sódio 0,6M. Secou-se com sulfato de sódio anidro e evaporou-se o solvente no evaporador rotativo.

Todos os ésteres obtidos foram analisados e caracterizados por <sup>1</sup>H-RMN e <sup>13</sup>C-RMN.

Tabela 3-1: Dados relativos ao grupo R e tempos de reação para os diferentes ésteres de cadeia alquílica curta do hidroxitirosol.

Antioxidante	Grupo R	Tempo de reação (dias)
HyTy-C2	CH <sub>3</sub>	2
HyTy-C4	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	2
HyTy-C6	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	3
HyTy-C8	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> CH <sub>3</sub>	2

### 3.1.1.2. Síntese de derivados do hidroxitirosol de cadeia alquílica longa (C12-C16)

Obtiveram-se os ésteres do hidroxitirosol de cadeia alquílica mais longa (C12-C16) por transesterificação com catálise enzimática, de acordo com o procedimento descrito por *João et al.* <sup>[13]</sup> Assim, procedeu-se à síntese prévia dos ésteres metílicos dos ácidos gordos, figura 3-2, para que pudessem ser utilizados posteriormente na reação de transesterificação, figura 3-3.

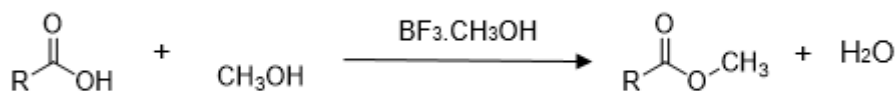


Figura 3-2: Formação de um éster metílico a partir do ácido (C12, C16) na presença de BF<sub>3</sub>·CH<sub>3</sub>OH em metanol. (R = (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>, n = 6, 8, 10, 14.)

Para um balão de fundo redondo de 100 mL, mediram-se 4 g de ácido (C12, C16) e 30 mL de solução metanólica de triflureto de boro (BF<sub>3</sub>·CH<sub>3</sub>OH). Deixou-se a reação a 100°C durante 4 horas. Ao fim desse tempo, arrefeceu-se o balão em banho de gelo e transferiu-se o seu conteúdo para uma ampola de decantação juntamente com 80 mL de éter etílico. Procedeu-se à lavagem da camada orgânica com três porções de 60 mL de solução saturada de cloreto de sódio (salmoura) e depois com 1 porção de 60 mL de água desionizada. Recolheu-se a camada orgânica, secou-se com sulfato de sódio anidro (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) e evaporou-se o solvente no evaporador rotativo.

Todos os ésteres obtidos foram analisados e caracterizados por <sup>1</sup>H-RMN e <sup>13</sup>C-RMN.



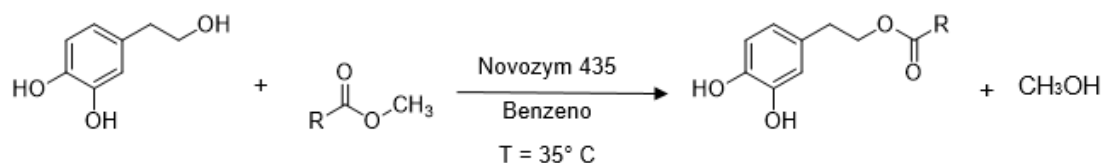


Figura 3-3: Síntese dos ésteres de hidroxitirosol de cadeia alquílica longa a partir de hidroxitirosol e éster metílico (C12, C16). (R = (CH<sub>2</sub>)<sub>n-1</sub>CH<sub>3</sub>, n = 7, 11, 15.)

Após a síntese dos ésteres metílicos dos ácidos gordos foi feita a síntese dos ésteres do hidroxitirosol de cadeia alquílica mais longa (C12-C16), figura 3-3. Para um balão de fundo redondo de 100 mL, mediram-se 3,24 mmol de hidroxitirosol e 9,72 mmol do éster metílico (C12, C16), 0,972 g de enzima Novozym 435 e ≈33 mL de benzeno. Deixou-se a reação a 35°C durante um determinado tempo, de acordo com o tempo indicado na tabela 3-2. No fim da reação, filtrou-se a enzima e procedeu-se à purificação da mistura por cromatografia em coluna, usando sílica 0,063-0,200 mm como fase estacionária e éter de petróleo/acetato de etilo 2:1 (v:v) como eluente. Acompanhou-se a purificação por cromatografia de camada fina (revelação UV e câmara de iodo). Após evaporação do solvente, os ésteres obtidos foram identificados por <sup>1</sup>H-RMN e <sup>13</sup>C-RMN.

Tabela 3-2: Dados relativos ao grupo R e tempos de reação para os diferentes ésteres de cadeia alquílica longa do hidroxitirosol.

Antioxidante	Grupo R	Tempo de reação (dias)
HyTy-C8	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> CH <sub>3</sub>	2
HyTy-C12	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>8</sub> CH <sub>3</sub>	3
HyTy-C16	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>12</sub> CH <sub>3</sub>	4

### 3.1.2. Síntese dos ésteres alquílicos derivados do ácido protocatecuico

#### 3.1.2.1. Síntese de derivados do ácido protocatecuico de cadeia alquílica curta (C1-C4)

Sintetizou-se os derivados de ácido protocatecuico por esterificação do ácido protocatecuico (PCA) com álcoois lineares de diferentes tamanhos (C2 e C4) e com catálise ácida, de acordo com o procedimento descrito por *Reis et al.*<sup>[18]</sup>

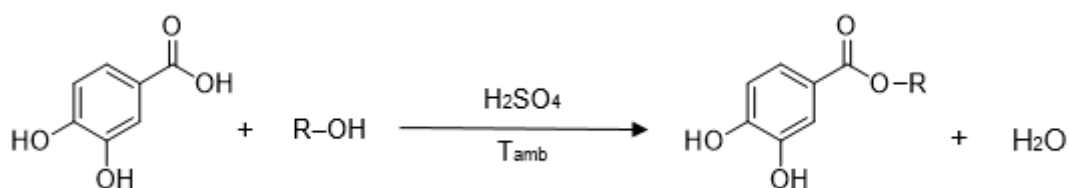


Figura 3-4: Síntese dos ésteres de ácido protocatecuico de cadeia alquílica curta a partir de ácido protocatecuico e álcool (C2, C4) na presença de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. (R = (CH<sub>2</sub>)<sub>n-1</sub>CH<sub>3</sub>, n = 2, 4.)

Para um balão de fundo redondo de 100mL transferiu-se 1g de ácido protocatecuico, 75 mL de álcool e 2mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Deixou-se a reação em refluxo durante 5 dias à temperatura ambiente, tabela 3-3. Posteriormente neutralizou-se a reação com solução aquosa de NaHCO<sub>3</sub> 1M (pH 7). Prosseguiu-se para a extração do éster da camada orgânica através de 3 porções de 150 mL de éter etílico. De seguida, após as extrações estarem concluídas, secou-se a camada orgânica com sulfato de sódio anidro (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) e realizou-se uma filtração de modo a removê-lo evaporando o solvente no fim deste processo.

De seguida procedeu-se à respetiva análise dos compostos por RMN (<sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C).

#### 3.1.2.2. Síntese de derivados do ácido protocatecuico de cadeia alquílica longa (C6-C16)

Através da reação de esterificação do ácido protocatecuico (PCA) com álcoois lineares de diferentes tamanhos (C6, C8, C12 e C16) e com catálise ácida (p-TsOH), de acordo com o procedimento descrito por *Reis et al.*<sup>[18]</sup> com algumas modificações, foram sintetizados os ésteres derivados do ácido protocatecuico de cadeia alquílica longa (C6-C16), figura 3-5.

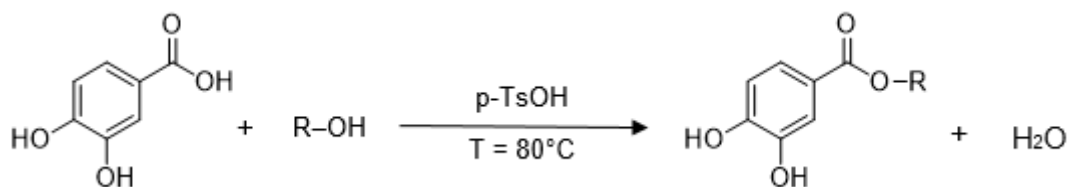


Figura 3-5: Síntese dos ésteres de ácido protocatecuico de cadeia alquílica longa a partir de ácido protocatecuico e álcool (C6, C8, C12, C16) na presença do catalisador p-TsOH. (R = (CH<sub>2</sub>)<sub>n-1</sub>CH<sub>3</sub>, n = 6, 8, 12, 16.)

Para um balão de fundo redondo de 100mL transferiu-se 0.00649 moles de PCA, 0.00649 moles de álcool, 10 mL de benzeno e 0.051 g de catalisador p-TsOH. Deixou-se a reação em refluxo durante os dias indicados na tabela 3-4 a uma temperatura de 80°C. Posteriormente adicionou-se 30mL de éter etílico. Prosseguiu-se para a extração do éster da camada orgânica com 8 porções de 30mL de solução aquosa de bicarbonato de sódio 0,6M (NaHCO<sub>3</sub>). De seguida, após as extrações estarem concluídas, secou-se a camada orgânica com sulfato de sódio anidro (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) e realizou-se uma filtração de modo a removê-lo evaporando o solvente no fim deste processo. A purificação realizou-se através de cromatografia em coluna com clorofórmio:metanol (98:2, v/v) como eluente.

De seguida procedeu-se à respetiva análise dos compostos por RMN (<sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C).

Tabela 3-3: Dados relativos ao grupo R e tempos de reação para os diferentes ésteres de cadeia alquílica longa do ácido protocatecuico.

Antioxidante	Grupo R	Tempo de reação (dias)
PCA-C6	C <sub>6</sub> H <sub>13</sub>	1
PCA-C8	C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>	2
PCA-C12	C <sub>12</sub> H <sub>25</sub>	1
PCA-C16	C <sub>16</sub> H <sub>33</sub>	6

### 3.1.2.3. Estudo da estabilidade do hidroxitirosol em PBS por UV-Visível

#### Preparação de soluções de antioxidante para análise UV-Visível

No estudo da estabilidade do hidroxitirosol em PBS realizaram-se medições de UV-Vis com controlo de temperatura ( $T = 37,0 \pm 0,1^\circ \text{C}$ ). Para tal preparou-se soluções de antioxidante em PBS com uma concentração de  $3,00 \times 10^{-4} \text{ M}$ , a partir de soluções padrão de antioxidante dissolvido em DMSO.

#### Estudo da estabilidade do hidroxitirosol por UV-Visível em PBS

Durante 5 horas, tempo superior ao tempo de realização do estudo da localização dos antioxidantes em lipossomas, fez-se o estudo da estabilidade do hidroxitirosol em PBS utilizando um espectrofotómetro fazendo o traçado da absorvância em função do comprimento de onda, para vários tempos, com controlo de temperatura a  $37^\circ \text{C}$ . As soluções de antioxidante foram todas estabilizadas a  $37^\circ \text{C}$  aquando a homogeneização das soluções, sendo que esta foi feita por três etapas de agitação com diferentes tempos e modos. O processo de preparação das soluções de antioxidantes para análise UV-Vis está indicado na tabela 3-5.

Tabela 3-4: Dados relativos aos tempos de agitação para os diferentes ésteres de cadeia alquílica curta do hidroxitirosol.

Antioxidante	Concentração da Solução (M)	Tempo de agitação manual (segundos)	Tempo de agitação em vórtex (minutos)	Tempo de agitação em ultrassons <sup>a</sup> (minutos)
HyTy	$3,003 \times 10^{-4}$	30	2	2
HyTy-C2	$3,008 \times 10^{-4}$		2	2
HyTy-C4	$3,000 \times 10^{-4}$		3	3
HyTy-C6	$2,992 \times 10^{-4}$		2	2
HyTy-C8	$2,995 \times 10^{-4}$		5	5

<sup>a</sup>Agitação num banho termostaticado a  $37^\circ \text{C}$

### **3.1.3. Sistemas miméticos de membranas biológicas**

#### **3.1.3.1. Síntese de lipossomas**

Para a preparação de lipossomas, optou-se pelo processo mais usual de preparação que se designa por método de hidratação do filme lipídico descrito por Bangham.<sup>[17]</sup>

Para um balão de fundo redondo dissolveu-se o lípido DMPC (2 mM) em clorofórmio. Evaporou-se o solvente orgânico até à secura, sob corrente de árgon de forma a obter um filme uniforme na parede do balão. De seguida, submeteu-se o filme a vácuo por um período mínimo de 3 horas, eliminando assim qualquer vestígio de solvente. Após esse tempo, hidratou-se o filme lipídico por adição de uma solução aquosa de tampão PBS (0,01 M; pH=7,4) e agitou-se em vórtice formando deste modo, vesículas multilamelares (MLV's).

Sujeitou-se as MLV's a dez ciclos de congelação/descongelação, utilizando azoto líquido (-196° C) e um banho termostatzado a 37° C.

Estabilizou-se a suspensão lipossómica a 37° C e ao abrigo da luz durante 30 minutos. Procedeu-se à passagem por filtros de polycarbonato de diâmetros diferentes (600 nm, 200 nm, 100 nm) no extrusor, obtendo-se uma suspensão de aspeto translúcido, constituída por lipossomas unilamelares com um diâmetro médio de 100 nm.

#### **3.1.3.2. Caracterização de lipossomas**

Determinou-se o diâmetro dos lipossomas, assim como o seu índice de polidispersão por espectroscopia de correlação fotónica, utilizando o programa Zetasizer. O valor do índice de polidispersão é indicativo do grau de heterogeneidade da amostra no que respeita ao tamanho. Assim, quanto maior o intervalo de diâmetros entre os quais se situa o diâmetro médio, ou seja, quanto maior for o desvio padrão, maior será o índice de polidispersão, cujo valor varia preferencialmente entre 0,0 e 0,1. Os valores de polidispersão menores que 0,1 significam que as várias populações de lipossomas preparadas para os diferentes estudos eram muito homogéneas em termos de diâmetro.

## **3.2. Localização dos antioxidantes em lipossomas de DMPC**

### **3.2.1. Anisotropia de fluorescência**

Os estudos da variação da anisotropia de fluorescência foram efetuados a 37° C, utilizando-se como sondas fluorescentes o DPH e o TMA-DPH.

A incorporação das sondas e do antioxidante efetuaram-se aquando da preparação dos filmes lipídicos por adição de volumes adequados das soluções de sonda e de antioxidante (100 µM, concentração final de antioxidante) à solução de lípido (1 mM, concentração final) em clorofórmio. Utilizou-se uma razão lípido/sonda em todos os ensaios de aproximadamente 300:1.

As leituras de anisotropia de fluorescência efetuaram-se com fendas de emissão e excitação de 5,0 nm e ao comprimento de onda de excitação de 360 nm e de emissão de 427 nm para o DPH, e o comprimento de onda de excitação de 365 nm e de emissão de 426 nm para o TMA-DPH.

### **3.2.2. Extinção da fluorescência**

Os estudos de fluorescência ao longo do tempo foram feitos a 37° C. Prepararam-se soluções contendo antioxidante dissolvido em DMSO, sendo que estas foram estabilizadas num banho a 37° C.

À suspensão lipídica com sonda (1mM) em tampão PBS, ao minuto 2, incubou-se uma quantidade de antioxidante (100µM), agitou-se manualmente a solução e mediu-se ao longo de 15 minutos a alteração de fluorescência.

### **3.2.3. Análise estatística**

Os resultados obtidos do estudo da anisotropia e da extinção de fluorescência foram analisados pelo programa estatístico SPSS, fazendo uma análise estatística por ANOVA - factor único com um nível de significância  $p \leq 0,05$ , usando o teste estatístico de *Duncan*.

## **CAPITULO 4: RESULTADOS E DISCUSSÃO**

## 4.1. Síntese dos ésteres alquílicos derivados do hidroxitirosol e do ácido protocatecuico

### 4.1.1. Síntese dos ésteres alquílicos derivados do hidroxitirosol

#### 4.1.1.1. Síntese de derivados do hidroxitirosol de cadeia alquílica curta (C1-C8)

Sintetizaram-se os ésteres de hidroxitirosol de cadeia alquílica curta (C1-C8) a partir da esterificação do HyTy com ácidos gordos de cadeia linear de diferentes tamanhos (C2, C4, C6 e C8). Os rendimentos obtidos nestas sínteses encontram-se na tabela 4-1.

Tabela 4-1: Resultados experimentais dos tempos de reação e dos rendimentos para a obtenção dos ésteres de cadeia alquílica curta de hidroxitirosol por esterificação enzimática.

Antioxidante	Grupo R	Tempo de reação (dias)	Rendimento, $\eta$ (%)
HyTy-C2	CH <sub>3</sub>	2	39,0
HyTy-C4	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	2	73,8
HyTy-C6	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	3	40,1
HyTy-C8	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> CH <sub>3</sub>	2	74,0

Em geral, verificou-se que à medida que a cadeia alquílica aumentava, o rendimento também aumentava, com exceção do éster HyTy-C6. O aumento do rendimento com o aumento da cadeia alquílica pode ser devido a os compostos com menor cadeia alquílica terem tendência para serem eliminados na fase aquosa durante a etapa de purificação. Os rendimentos descritos foram similares aos descritos na bibliografia<sup>[13]</sup>.



#### 4.1.1.2. Síntese de derivados do hidroxitirosol de cadeia alquílica longa (C12-C16)

Os ésteres de HyTy de cadeia alquílica longa (C12-C16) foram sintetizados a partir da esterificação do HyTy com os ésteres metílicos dos ácidos gordos (C12 e C16) obtidos comercialmente. Os rendimentos obtidos pelas sínteses encontram-se na tabela 4-2.

Tabela 4-2: Resultados experimentais dos tempos de reação e dos rendimentos para a obtenção dos ésteres de cadeia alquílica longa de hidroxitirosol por transesterificação enzimática.

Antioxidante	Grupo R	Tempo de reação (dias)	Rendimento, $\eta$ (%)
HyTy-C12	$\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_8\text{CH}_3$	3	46,3
HyTy-C16	$\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{12}\text{CH}_3$	4	45,7

Os rendimentos obtidos para os ésteres HyTy-C12 e HyTy-C16 são relativamente mais baixos comparados com os rendimentos dos ésteres de cadeia curta (C1-C8) devido à dificuldade de purificação por cromatografia em coluna, uma vez que os ésteres de HyTy obtidos e os ésteres metílicos utilizados na transesterificação, apresentam polaridades semelhantes nos vários eluentes testados.

#### 4.1.1.3. Caracterização dos ésteres derivados do hidroxitirosol

Os vários ésteres do hidroxitirosol sintetizados foram caracterizados por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de próton ( $^1\text{H}$ -RMN) e carbono 13 ( $^{13}\text{C}$ -RMN).

A figura 4-1 apresenta a estrutura numerada do éster de hidroxitirosol, para futura numeração de cada sinal interpretado, em que  $n'$  ( $n'=1, 2, 3... 15$ ) corresponde ao carbono em questão (e seus hidrogénios associados) ao longo da cadeia alquílica.

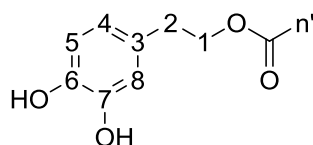


Figura 4-1: Esquema numerado para a interpretação dos espectros de RMN para os ésteres sintetizados.

### 1) Etanoato de hidroxitirosilo (HyTy-C2)

$^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ):  $\delta$  6,75 (d,  $J = 8,0$  Hz, 1H, H5); 6,74 (d,  $J = 8,0$  Hz, 1H, H8); 6,58 (dd,  $J_3 = 8,0$  Hz,  $J_4 = 2,0$  Hz, 1H, H4); 4,15 (t,  $J = 8,0$  Hz, 2H, H1); 2,76 (t,  $J = 8,0$  Hz, 2H, H2); 1,96 (t,  $J = 8,0$  Hz, 3H, H1')

$^{13}\text{C}$  RMN (101 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ):  $\delta$  170,0 (C9); 145,0 (C7); 143,6 (C6); 129,7 (C3); 120,1 (C4); 115,9 (C5); 115,2 (C8); 64,8 (C1); 34,2 (C2); 27,0 (C1')

### 2) Butanoato de hidroxitirosilo (HyTy-C4)

$^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ):  $\delta$  6,76 (d,  $J = 8,0$  Hz, 1H, H5); 6,75 (d,  $J = 8,0$  Hz, 1H, H8); 6,58 (dd,  $J_3 = 8,0$  Hz,  $J_4 = 2,0$  Hz, 1H, H4); 4,18 (t,  $J = 8,0$  Hz, 2H, H1); 2,76 (t,  $J = 8,0$  Hz, 2H, H2); 2,24 (t,  $J = 8,0$  Hz, 2H, H1'); 1,58 (sext,  $J = 8,0$  Hz, 2H, H2'); 0,89 (t,  $J = 8,0$  Hz, 3H, H3')

C RMN (100 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ):  $\delta$  173,5 (C9); 145,9 (C7); 144,5 (C6); 130,6 (C3); 121,0 (C4); 116,8 (C5); 116,0 (C8); 65,6 (C1); 36,5 (C2); 35,2 (C1'); 19,0 (C2'); 13,8 (C3')

### 3) Hexanoato de hidroxitirosilo (HyTy-C6)

$^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ):  $\delta$  6,75 (d,  $J = 8,0$  Hz, 1H, H5); 6,74 (d,  $J = 8,0$  Hz, 1H, H8); 6,58 (dd,  $J_3 = 8,0$  Hz,  $J_4 = 2,0$  Hz, 1H, H4); 4,18 (t,  $J = 8,0$  Hz, 2H, H1); 2,77 (t,  $J = 8,0$  Hz, 2H, H2); 2,26 (t,  $J = 8,0$  Hz, 2H, H1'); 1,57 (quint,  $J = 8,0$  Hz, 2H, H2'); 1,28 (m, 4H, H3'-H4'); 0,88 (t,  $J = 8,0$  Hz, 3H, H5')

$^{13}\text{C}$  RMN (100 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ):  $\delta$  172,8 (C9); 145,0 (C7); 143,6 (C6); 129,7 (C3); 120,1 (C4); 115,9 (C5); 115,2 (C8); 64,7 (C1); 34,3 (C2); 33,7 (C1'); 31,1 (C2'); 24,5 (C3'); 22,1 (C4'); 13,3 (C5')

### 4) Octanoato de hidroxitirosilo (HyTy-C8)

$^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ):  $\delta$  6,75 (d,  $J = 8,0$  Hz, 1H, H5); 6,74 (d,  $J = 8,0$  Hz, 1H, H8); 6,58 (dd,  $J_3 = 8,0$  Hz,  $J_4 = 2,0$  Hz, 1H, H4); 4,17 (t,  $J = 8,0$  Hz, 2H, H1); 2,77 (t,  $J = 8,0$  Hz, 2H, H2); 2,26 (t,  $J = 8,0$  Hz, 2H, H1'); 1,57 (quint,  $J = 8,0$  Hz, 2H, H2'); 1,28 (m, 6H, H3'-H6'); 0,88 (t,  $J = 8,0$  Hz, 3H, H7')

$^{13}\text{C}$  RMN (100 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ):  $\delta$  172,7 (C9); 145,0 (C7); 143,9 (C6); 129,7 (C3); 120,1 (C4); 115,8 (C5); 115,2 (C8); 64,7 (C1); 34,3 (C2); 33,8 (C1'); 31,5 (C2'); 24,8 (C3'); 24,8 (C4'); 22,4 (C5'); 22,4 (C6'); 13,4 (C7')

#### **5) Dodecanoato de hidroxitirosilo (HyTy-C12)**

$^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ):  $\delta$  6,75 (d,  $J = 8,0$  Hz, 1H, H5); 6,74 (d,  $J = 8,0$  Hz, 1H, H8); 6,58 (dd,  $J_3 = 8,0$  Hz,  $J_4 = 2,0$  Hz, 1H, H4); 4,17 (t,  $J = 8,0$  Hz, 2H, H1); 2,77 (t,  $J = 8,0$  Hz, 2H, H2); 2,26 (t,  $J = 8,0$  Hz, 2H, H1'); 1,57 (quint,  $J = 8,0$  Hz, 2H, H2'); 1,29 (m, 16H, H3'-H10'); 0,88 (t,  $J = 8,0$  Hz, 3H, H11')

$^{13}\text{C}$  RMN (100 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ):  $\delta$  172,7 (C9); 145,0 (C7); 143,6 (C6); 129,7 (C3); 120,1 (C4); 115,8 (C5); 115,2 (C8); 64,7 (C1); 34,3 (C2); 33,8 (C1'); 31,7 (C2'); 24,8 (C3'); 24,8 (C4'); 24,8 (C5'); 24,8 (C6'); 22,4 (C7'); 22,4 (C8'); 22,4 (C9'); 22,4 (C10'); 13,5 (C11')

#### **6) Hexadecanoato de hidroxitirosilo (HyTy-C16)**

$^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ):  $\delta$  6,75 (d,  $J = 8,0$  Hz, 1H, H5); 6,74 (d,  $J = 8,0$  Hz, 1H, H8); 6,58 (dd,  $J_3 = 8,0$  Hz,  $J_4 = 2,0$  Hz, 1H, H4); 4,17 (t,  $J = 8,0$  Hz, 2H, H1); 2,76 (t,  $J = 8,0$  Hz, 2H, H2); 2,26 (t,  $J = 8,0$  Hz, 2H, H1'); 1,57 (quint,  $J = 8,0$  Hz, 2H, H2'); 1,29 (m, 24H, H3'-H14'); 0,88 (t,  $J = 8,0$  Hz, 3H, H15').

$^{13}\text{C}$  RMN (100 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ):  $\delta$  173,6 (C9); 145,9 (C7); 144,5 (C6); 130,6 (C3); 122,0 (C4); 116,8 (C5); 116,0 (C8); 65,6 (C1); 35,2 (C2); 34,7 (C1'); 32,7 (C2'); 25,7 (C3'); 25,7 (C4'); 25,7 (C5'); 25,7 (C6'); 25,7 (C7'); 25,7 (C8'); 23,3 (C9'); 23,3 (C10'); 23,3 (C11'); 23,3 (C12'); 23,3 (C13'); 23,3 (C14'); 14,4 (C15').

## **4.1.2. Síntese dos ésteres alquílicos derivados do ácido protocatecuico**

### **4.1.2.1. Síntese de derivados do ácido protocatecuico de cadeia alquílica curta (C1-C4)**

Os ésteres do ácido protocatecuico de cadeia alquílica curta (C1-C4) foram sintetizados por esterificação do ácido protocatecuico (PCA) com álcoois lineares de diferentes tamanhos (C2 e C4). Os rendimentos obtidos nas sínteses encontram-se na tabela 4-3.

Tabela 4-3: Resultados experimentais dos tempos de reação e dos rendimentos obtidos para a obtenção dos ésteres de cadeia alquílica curta de ácido protocatecuico por esterificação.

Antioxidante	Grupo R	Tempo de reação (dias)	Catalisador	Rendimento, $\eta$ (%)
PCA-C2*	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	5	-	-
PCA-C4	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>	5	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> concentrado	35,5

\* PCA-C2 – Composto obtido comercialmente

O rendimento obtido para o éster PCA-C4 foi o mais baixo possivelmente porque foi necessária mais uma etapa de purificação (cristalização em hexano), devido à dificuldade para evaporar o butanol.

### **4.1.2.2. Síntese de derivados do ácido protocatecuico de cadeia alquílica longa (C6-C16)**

A síntese dos ésteres do ácido protocatecuico de cadeia alquílica longa (C6-C16) ocorreu através da reação do mesmo com álcoois lineares de diferentes tamanhos (C6, C8, C12 e C16), utilizando como catalisador p-TsOH. Os rendimentos obtidos nas sínteses encontram-se na tabela 4-4.

Tabela 4-4: Resultados experimentais dos tempos de reação e dos rendimentos obtidos para a obtenção dos ésteres de cadeia alquílica longa de ácido protocatecuico por esterificação.

Antioxidante	Grupo R	Tempo de reação (dias)	Catalisador	Rendimento, $\eta$ (%)
PCA-C6	C <sub>6</sub> H <sub>13</sub>	1	p-TsOH	34,0
PCA-C8	C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>	2	p-TsOH	30,5
PCA-C12	C <sub>12</sub> H <sub>25</sub>	1	p-TsOH	19,3
PCA-C16	C <sub>16</sub> H <sub>33</sub>	6	p-TsOH	13,2

À medida que a cadeia alquílica aumenta, a polaridade do álcool e do respectivo éster fica cada vez mais semelhante o que dificultou a sua purificação, levando assim a menores valores de rendimento.

#### 4.1.2.3. Caracterização dos ésteres derivados do ácido protocatecuico

Os vários compostos sintetizados foram caracterizados por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de próton (<sup>1</sup>H-NMR) e carbono 13 (<sup>13</sup>C-NMR).

A figura 4-2 apresenta a estrutura numerada do éster do ácido protocatecuico, para futura numeração de cada sinal interpretado, em que n' (n'=1, 2, 3... 16) corresponde ao carbono em questão (e seus hidrogénios associados) ao longo da cadeia alquílica.

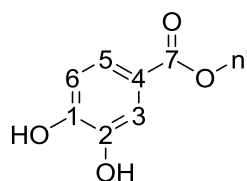


Figura 4-2: Esquema numerado para a interpretação dos espectros de NMR para os ésteres sintetizados.

### 1) Protocatecuato de Etilo (PCA-C2)

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ )  $\delta$  7,50 (d,  $J = 2,0$  Hz, 1H, H3), 7,45 (dd,  $J_{3,5} = 2,0$  Hz,  $J_{5,6} = 8,0$  Hz, 1H, H5), 6,90 (d,  $J = 8,0$  Hz, 1H, H6), 4,27 (q,  $J = 7,1$  Hz, 2H, H1'), 1,32 (t,  $J = 7,1$  Hz, 3H, H2').

$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ )  $\delta$  166,55 (C7), 150,64 (C1), 145,54 (C2), 123,26 (C4), 123,21 (C5), 117,13 (C6), 115,72 (C3), 60,85 (C1'), 14,61 (C2').

### 2) Protocatecuato de Butilo (PCA-C4)

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ )  $\delta$  7,51 (d,  $J = 2,0$  Hz, 1H, H3), 7,45 (dd,  $J_{3,5} = 2,0$  Hz,  $J_{5,6} = 8$  Hz, 1H, H5), 6,90 (d,  $J = 8,0$  Hz, 1H, H6), 4,23 (t,  $J = 6,6$  Hz, 2H, H1'), 1,71 (q,  $J = 7,9$  Hz, 2H, H2'), 1,47 (sext,  $J = 7,6$  Hz, 2H, H3'), 0,96 (t,  $J = 7,4$  Hz, 3H, H4').

$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ )  $\delta$  166,70 (C7), 150,78 (C1), 145,68 (C2), 123,37 (C4), 123,33 (C5), 117,24 (C6), 115,86 (C3), 64,79 (C1'), 31,72 (C2'), 20,04 (C3'), 14,10 (C4').

### 3) Protocatecuato de Hexilo (PCA-C6)

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ )  $\delta$  7,51 (d,  $J = 1,9$  Hz, 1H, H3), 7,45 (dd,  $J_{3,5} = 2,0$  Hz,  $J_{5,6} = 8,3$  Hz, 1H, H5), 6,90 (d,  $J = 8,3$  Hz, 1H, H6), 4,23 (t,  $J = 6,6$  Hz, 2H, H1'), 1,73 (q,  $J = 7,9$  Hz, 2H, H2'), 1,45 (q,  $J = 6,9$  Hz, 2H, H3'), 1,35 (m, 4H, H3'-H4'), 0,90 (t,  $J = 7,0$  Hz, 3H, H6').

$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ )  $\delta$  166,70 (C7), 150,78 (C1), 145,69 (C2), 123,36 (C4), 123,33 (C5), 117,24 (C6), 115,86 (C3), 65,10 (C1'), 32,32 (C2), 29,51 (C3'), 26,56 (C4'), 23,32 (C5'), 14,36 (C6').

### 4) Protocatecuato de Octilo (PCA-C8)

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ )  $\delta$  7,51 (d,  $J = 2,0$  Hz, 1H, H3), 7,45 (dd,  $J_{3,5} = 2,0$  Hz,  $J_{5,6} = 8,3$  Hz, 1H, H5), 6,90 (d,  $J = 8,3$  Hz, 1H, H6), 4,23 (t,  $J = 6,6$  Hz, 2H, H1'), 1,73 (q,  $J = 7,9$  Hz, 2H, H2'), 1,54 – 1,21 (m, 10H, H3'-H7'), 0,88 (t,  $J = 6,9$  Hz, 3H, H8').

$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ )  $\delta$  166,61 (C7), 150,69 (C1), 145,61 (C2), 123,28 (C4), 123,23 (C5), 117,16 (C6), 115,77 (C3), 65,02 (C1'), 32,55 (C2'), 29,99 (C3'), 29,97 (C4'), 29,56 (C5'), 26,81 (C6'), 23,30 (C7'), 14,34 (C8').

#### 5) Protocatecuato de Dodecilo (PCA-C12)

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ )  $\delta$  7,51 (d,  $J = 2,0$  Hz, 1H, H3), 7,46 (d,  $J_{3,5} = 2,0$  Hz,  $J_{5,6} = 8,3$  Hz, 1H, H5), 6,89 (d,  $J = 8,3$  Hz, 1H, H6), 4,23 (t,  $J = 6,6$  Hz, 2H, H1'), 1,73 (q,  $J = 7,9$  Hz, 2H, H2'), 1,51 – 1,18 (m, 18H, H3'-H11'), 0,87 (t,  $J = 6,8$  Hz, 3H, H12').

$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ )  $\delta$  166,62 (C7), 150,69 (C1), 145,62 (C2), 123,27 (C4), 123,21 (C5), 117,18 (C6), 115,77 (C3), 65,02 (C1'), 30,38 (C2'), 30,36 (C3'), 30,32 (C4'), 30,29 (C5'), 30,07 (C6'-C8'), 29,57 (C10'), 26,81 (C9'), 23,33 (C11'), 14,35 (C12').

#### 6) Protocatecuato de Hexadecilo (PCA-C16)

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ )  $\delta$  7,51 (d,  $J = 2,0$  Hz, 1H, H3), 7,45 (d,  $J_{3,5} = 2,0$  Hz,  $J_{5,6} = 8,3$  Hz, 1H, H5), 6,89 (d,  $J = 2,0$  Hz, 1H, H6), 4,23 (t,  $J = 6,6$  Hz, 2H, H1'), 1,74 (q,  $J = 8,0$  Hz, 2H, H2'), 1,53 – 1,22 (m, 26H, H3'-H15'), 0,88 (t,  $J = 6,9$  Hz, 3H, H16').

$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ )  $\delta$  165,70 (C7), 149,78 (C1), 144,70 (C2), 122,42 (C4), 122,37 (C5), 116,27 (C6), 114,86 (C3), 64,11 (C1'), 31,74 (C3'), 29,46 (C2'), 29,42 (C4'), 29,39 (C5'-C11'), 29,17 (C12'), 28,66 (C14'), 25,90 (C13'), 22,42 (C15'), 13,44 (C16').

## 4.2. Estudo da estabilidade do hidroxitirosol por UV-Visível

De forma a estudar a estabilidade do hidroxitirosol em PBS para posterior estudo de localização dos antioxidantes em lipossomas, preparou-se soluções padrão de antioxidante dissolvido em DMSO. A partir destas soluções padrão de antioxidante, foram preparadas soluções de antioxidante em PBS com concentração  $3 \times 10^{-4}$  M, para posterior análise por UV-Visível com controlo de temperatura a  $37^\circ\text{C}$  durante 5 horas. Os espectros obtidos da absorvância em função do comprimento de onda, para vários tempos, com controlo de temperatura a  $37^\circ\text{C}$  para o hidroxitirosol e cada um dos ésteres alifáticos sintetizados estão nas figuras 4-3, 4-4, 4-5, 4-6 e 4-7.

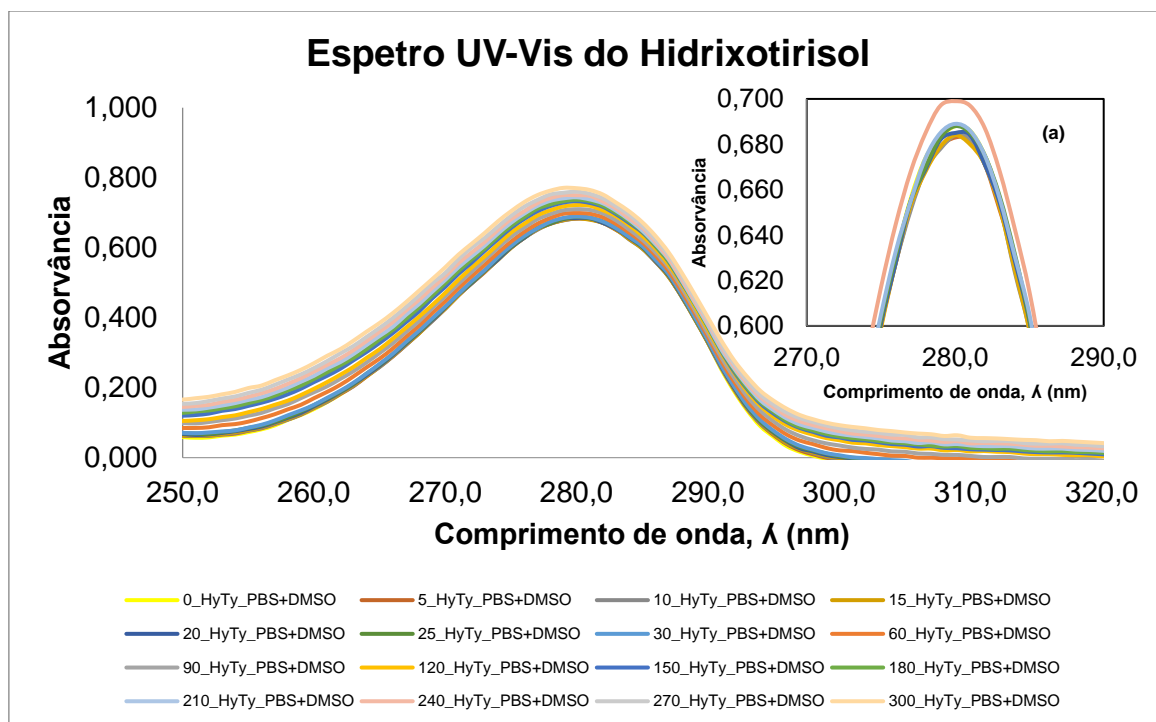


Figura 4-3: Representação gráfica do espectro de UV-Vis do hidroxitirosol  $3,003 \times 10^{-4}$  M dissolvido em PBS durante 5 horas. (a) Imagem ampliada dos primeiros 60 minutos. (Legenda: Tempo em minutos de medição da absorvância em função do comprimento de onda.)



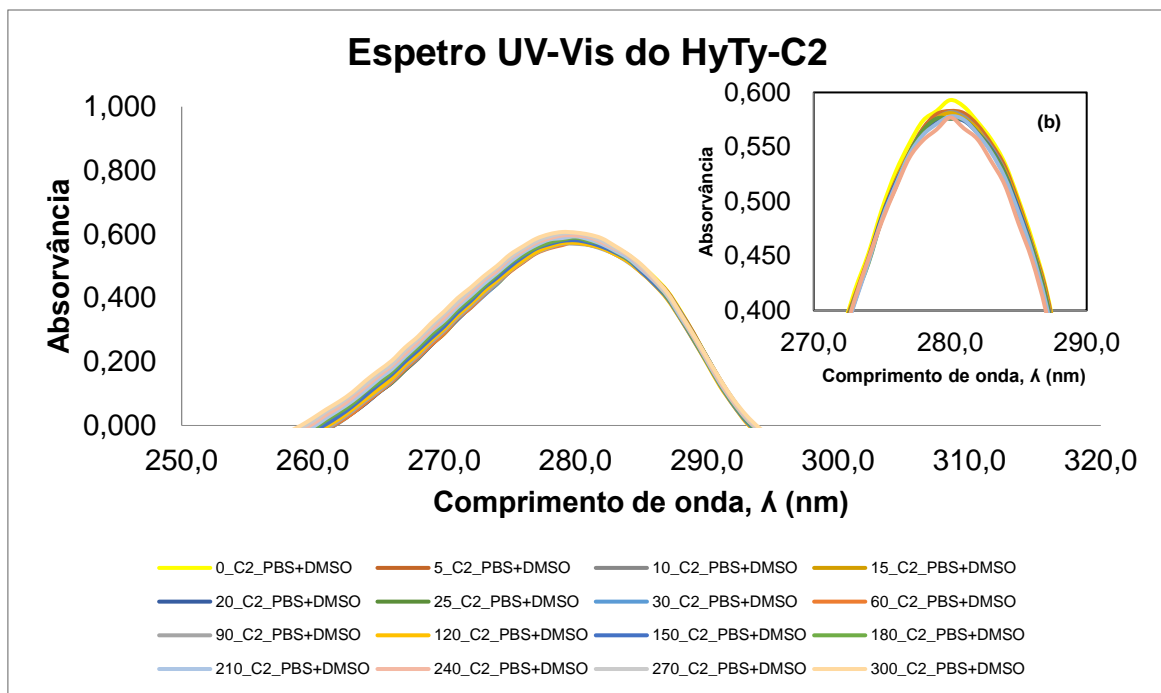


Figura 4-4: Representação gráfica do espectro de UV-Vis do etanoato de hidroxitirosilo  $3,008 \times 10^{-4}$  M dissolvido em PBS durante 5 horas. (b) Imagem ampliada dos primeiros 60 minutos. (Legenda: Tempo em minutos de medição da absorvância em função do comprimento de onda.)

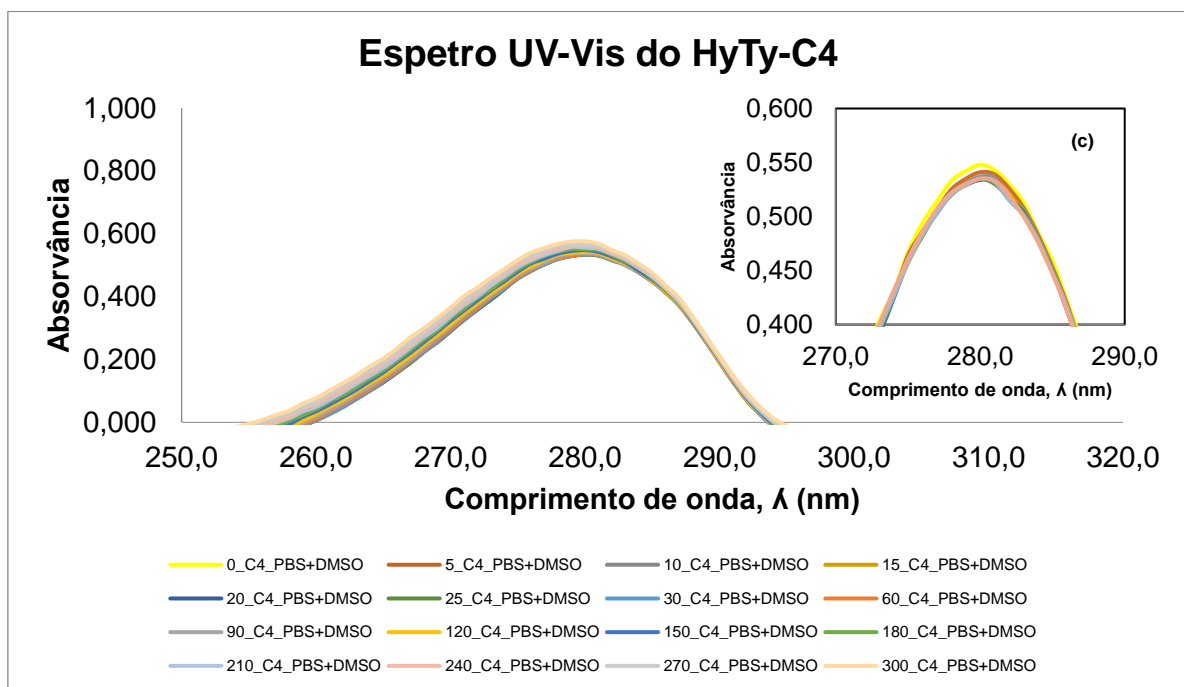


Figura 4-5: Representação gráfica do espectro de UV-Vis do butanoato de hidroxitirosilo  $3,000 \times 10^{-4}$  M dissolvido em PBS durante 5 horas. (c) Imagem ampliada dos primeiros 60 minutos. (Legenda: Tempo em minutos de medição da absorvância em função do comprimento de onda.)

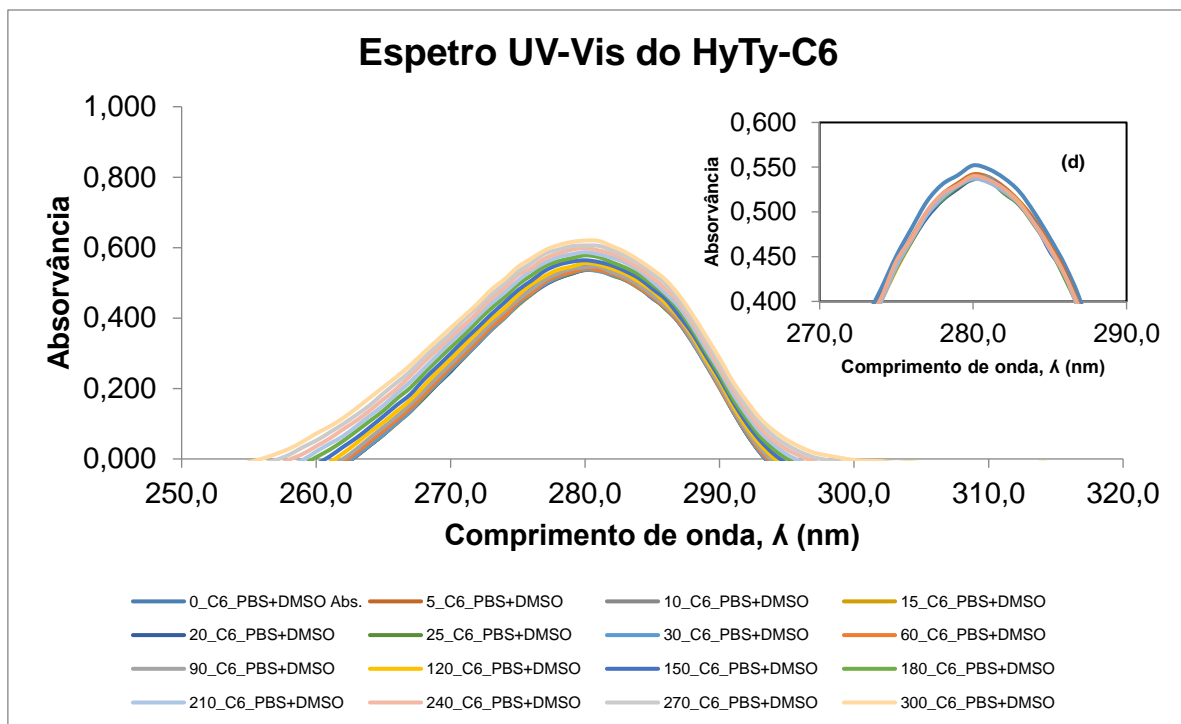


Figura 4-6: Representação gráfica do espectro de UV-Vis do hexanoato de hidroxitirosilo  $2,992 \times 10^{-4}$  M dissolvido em PBS durante 5 horas. (d) Imagem ampliada dos primeiros 60 minutos. (Legenda: Tempo em minutos de medição da absorvância em função do comprimento de onda.)

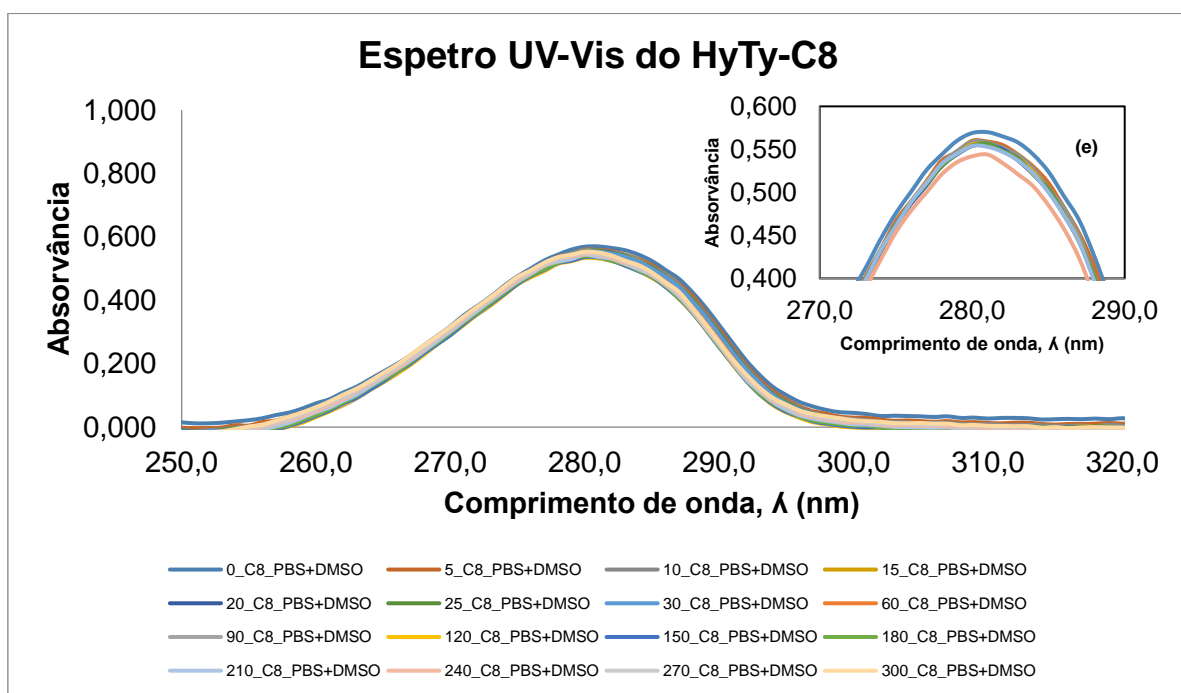


Figura 4-7: Representação gráfica do espectro de UV-Vis do octanoato de hidroxitirosilo  $2,995 \times 10^{-4}$  M dissolvido em PBS durante 5 horas. (e) Imagem ampliada dos primeiros 60 minutos. (Legenda: Tempo em minutos de medição da absorvância em função do comprimento de onda.)

Pela análise dos espectros de estabilidade do HyTy e dos ésteres C2, C4, C6 e C8, podemos verificar que ocorre uma alteração de cerca de 2% nos valores de absorvância ao fim de cerca de 60 minutos. Possivelmente isto deve-se ao facto de que num meio de pH fisiológico, os compostos podem começar a oxidar-se, formando novas espécies. No entanto, o período de tempo necessário para fazer o estudo da localização de antioxidantes é de 15 minutos pelo que podemos considerar o HyTy e os ésteres estáveis obtendo assim resultados precisos e fidedignos. O estudo da estabilidade dos ésteres C12 e C16 por UV-Vis não foram realizadas pois após a preparação da solução, ocorria a formação de micelas.

## **4.3. Caracterização dos sistemas miméticos de membranas biológicas**

### **4.3.1. Caracterização de lipossomas de DMPC**

Obtiveram-se suspensões de LUV's com diâmetros entre 93,17 – 117,9 nm e com valores de polidispersão compreendidos entre 0,060 - 0,099. Através dos valores obtidos podemos concluir que as suspensões lipossómicas eram bastante homogêneas em termos de tamanhos uma vez que os valores de polidispersão são inferiores a 0,1.

## **4.4. Localização dos antioxidantes em lipossomas de DMPC**

A localização dos antioxidantes na bicamada fosfolipídica foi estudada por determinação da anisotropia de fluorescência das sondas de DPH e TMA-DPH incorporadas em lipossomas de DMPC contendo o antioxidante incorporado, e por determinação da extinção de fluorescência das sondas (DPH ou TMA-DPH) incorporadas nos lipossomas com posterior incubação de antioxidante, tal como descrito no tópico 3.2.

Foram testados os ésteres HyTy-C2, HyTy-C4, HyTy-C6, HyTy-C8, HyTy-C12 e HyTy-C16 assim como o HyTy em ambos os métodos de localização, com as duas sondas. Para o ácido protocatecuico e os seus ésteres PCA-C2, PCA-C4, PCA-C6, PCA-C8, PCA-C12 e PCA-C16, só foi realizada a determinação da extinção de fluorescência utilizando a sonda DPH, pois não houve tempo para realizar estudo da extinção de fluorescência com a sonda TMA-DPH, assim como o estudo de anisotropia em estado estacionário utilizando as duas sondas.

#### 4.4.1. Anisotropia de fluorescência em estado estacionário

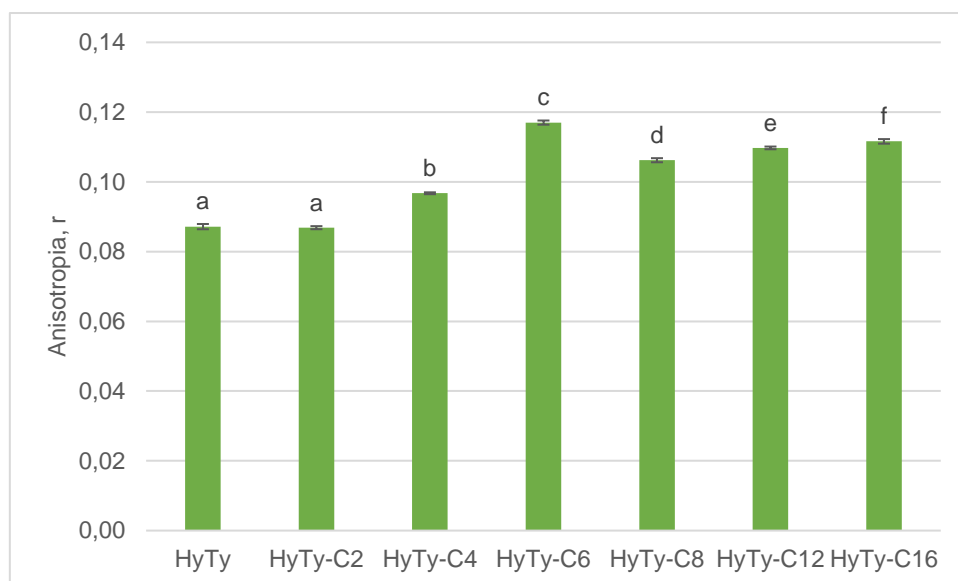
Os efeitos da presença de antioxidantes na bicamada de DMPC foram investigados recorrendo-se à incorporação membranar das sondas de fluorescência DPH e TMA-DPH. A localização do TMA-DPH na zona mais externa dos lipossomas, próximos das cabeças polares dos fosfolípidos, permitirá obter informação de alterações ocorridas na interface lipossoma/água, enquanto o DPH com localização mais interna, ao nível das cadeias hidrocarbonadas dos fosfolípidos, permitirá aceder às alterações sentidas no interior hidrofóbico da membrana.

Os estudos da variação da anisotropia de fluorescência fizeram-se a 37° C, utilizando-se como sondas fluorescentes o DPH e o TMA-DPH.

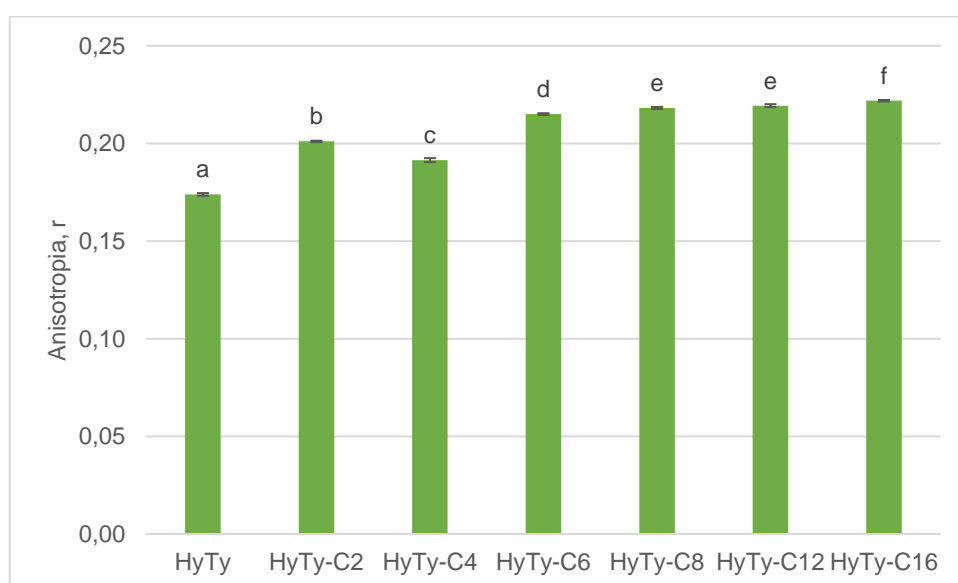
Os valores de anisotropia de fluorescência das sondas DPH e TMA-DPH a 37° C na presença dos vários ésteres de hidroxitirosol usados e do hidroxitirosol encontram-se na tabela 4-6. Os espetros obtidos do estudo da anisotropia de fluorescência das sondas DPH e TMA-DPH a 37° C na presença dos vários ésteres de hidroxitirosol usados e do hidroxitirosol estão representados nas figuras 4-8 e 4-9.

Tabela 4-5: Valores de anisotropia do hidroxitirosol e dos seus ésteres utilizando as sondas DPH e TMA-DPH incorporadas em lipossomas de DMPC (1mM), juntamente com 100 µM de antioxidante, a 37° C.

Antioxidante	Valores de anisotropia	
	DPH	TMA-DPH
HyTy	0,0872	0,1739
HyTy-C2	0,0869	0,2010
HyTy-C4	0,0967	0,1914
HyTy-C6	0,1170	0,2150
HyTy-C8	0,1062	0,2181
HyTy-C12	0,1097	0,2193
HyTy-C16	0,1116	0,2219



**Figura 4-8:** Valores de anisotropia da sonda DPH incorporada em lipossomas de DMPC (1mM), juntamente com 100  $\mu\text{M}$  de antioxidante, a 37° C. (barras de erro representam o erro padrão; letras iguais correspondem a valores estatisticamente iguais). DMPC c/DPH 1mM c/[AO] 100  $\mu\text{M}$  ([AO] = HyTy, HyTy-C2, HyTy-C4, HyTy-C6, HyTy-C8, HyTy-C12, HyTy-C16)



**Figura 4-9:** Valores de anisotropia da sonda TMA-DPH incorporada em lipossomas de DMPC (1mM), juntamente com 100  $\mu\text{M}$  de antioxidante, a 37° C. (barras de erro representam o erro padrão; letras iguais correspondem a valores estatisticamente iguais). DMPC c/TMA-DPH 1mM c/[AO] 100  $\mu\text{M}$  ([AO] = HyTy, HyTy-C2, HyTy-C4, HyTy-C6, HyTy-C8, HyTy-C12, HyTy-C16)

Pela análise das figuras 4-8 e 4-9 podemos concluir que ocorre a interação dos antioxidantes com a membrana utilizando ambas as sondas. O HyTy é o que apresenta valores de anisotropia mais baixos, o que indica que é o que menos interage com a membrana e consequentemente com as sondas, possivelmente devido ao seu elevado carácter hidrofílico.

Na presença dos ésteres HyTy-C2, HyTy-C4, HyTy-C6, HyTy-C8, HyTy-C12 e HyTy-C16 verifica-se um aumento dos valores de anisotropia em ambas as sondas, aproximadamente de 10-25% com respeito ao valor obtido para o HyTy na sonda DPH, e aproximadamente de 9-22% na sonda TMA-DPH. Por exemplo, o éster HyTy-C4 apresenta um aumento nos valores de anisotropia relativamente aos valores do HyTy de cerca de 9% e 10%, para a sonda DPH e para a sonda TMA-DPH respetivamente, enquanto o éster HyTy-C16 apresenta um aumento nos valores de anisotropia de cerca de 22% para ambas as sondas, comparativamente com os valores obtido para o HyTy. Podemos assim concluir, que com o aumento da cadeia alquílica dos ésteres verifica-se um aumento semelhante dos valores de anisotropia em ambas as sondas. Este aumento de anisotropia significa que todos os ésteres do hidroxitirosol testados interagem com a bicamada fosfolipídica tanto a nível das cabeças hidrofílicas como das caudas hidrofóbicas. Esta interação mostra que uma pequena alteração na estrutura química do hidroxitirosol aumenta a sua hidrofobicidade permitindo a interação com o interior da membrana.

Os derivados alquílicos C2-C4 apresentam valores mais baixos do que os ésteres mais hidrofóbicos (C6-C16), possivelmente porque interagem ou penetram menos na membrana devido a terem uma menor cadeia hidrocarbonada e como consequência, uma menor hidrofobicidade.

#### **4.4.2. Extinção de fluorescência**

##### **4.4.2.1. Extinção de fluorescência na presença de hidroxitirosol e dos seus ésteres alquílicos**

Para a extinção de fluorescência se verificar, é necessário que o desativador (antioxidante) esteja localizado na proximidade do fluoróforo (sonda) para que possa ocorrer interação entre eles. Assim, a eficácia relativa da extinção de uma série de sondas pode ser usada para inferir acerca da localização relativa de uma molécula nos lipossomas.

Os estudos de fluorescência ao longo do tempo foram feitos a 37° C. Prepararam-se soluções contendo antioxidante dissolvido em DMSO, sendo que estas foram estabilizadas num banho a 37° C.

À suspensão lipídica (1mM) com sonda em tampão PBS, ao minuto 2, incubou-se uma quantidade de antioxidante (100µM), agitou-se manualmente a solução e mediu-se ao longo de 15 minutos a alteração de fluorescência.

Os perfis de extinção de fluorescência das sondas DPH e TMA-DPH em função do tempo, em lipossomas de DMPC, contendo os diferentes ésteres e o hidroxitirosol estão representados nas figuras 4-10 e 4-11. Estes valores foram obtidos pela diferença entre os valores de extinção de fluorescência da suspensão lipossômica sem antioxidante e os valores de extinção de fluorescência ao fim de 15 minutos de incubação do antioxidante nos lipossomas.

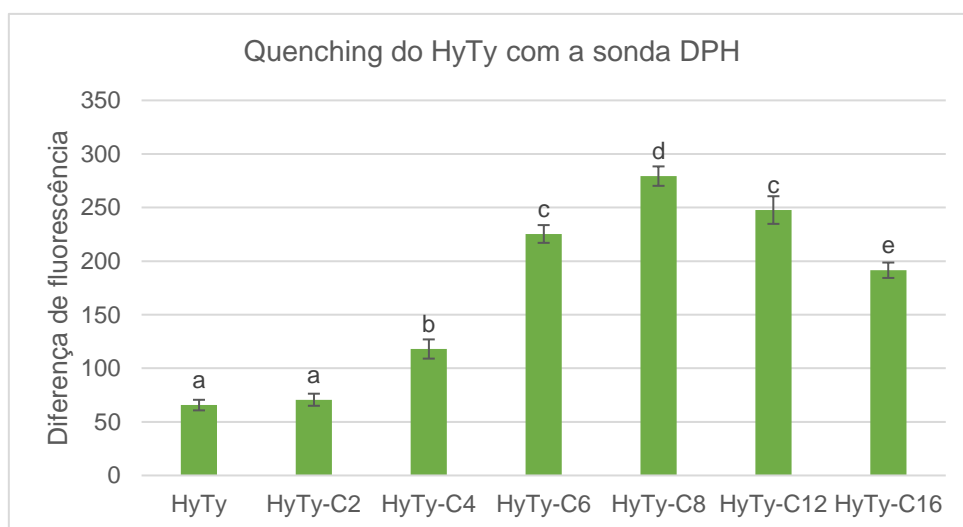


Figura 4-10: Valores da variação de fluorescência da sonda DPH incorporada em lipossomas de DMPC (1mM) numa proporção sonda/lípido de 1:300 e após adição de antioxidante 100 µM, a 37° C. (barras de erro representam o erro padrão; letras iguais correspondem a valores estatisticamente iguais).

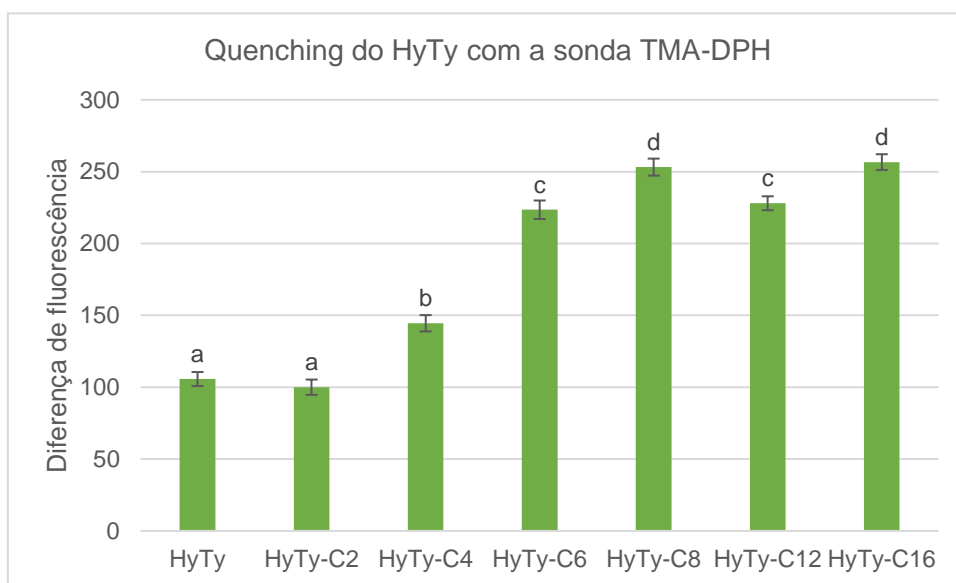


Figura 4-11: Valores da variação de fluorescência da sonda TMA-DPH incorporada em lipossomas de DMPC (1mM) numa proporção sonda/lípido de 1:300 e após adição de antioxidante 100 µM, a 37° C. (barras de erro representam o erro padrão; 48 letras iguais correspondem a valores estatisticamente iguais).

Pela análise das figuras 4-10 e 4-11 onde estão representadas os perfis de extinção de fluorescência do HyTy e seus ésteres com as sondas DPH e TMA-DPH é possível verificar que todos os antioxidantes em estudo causaram extinção da fluorescência. Esta extinção de fluorescência deve-se ao facto de o aumento da cadeia carbonada alterar a estrutura química do HyTy tornando-o mais hidrofóbico e permitindo que este interaja melhor com o interior da membrana. Ao interagir com o interior da membrana, os ésteres do HyTy também entrarão em contacto com a sonda de TMA-DPH localizada na zona mais exterior da membrana e com a sonda de DPH que está incorporada na bicamada fosfolipídica. Estas interações são responsáveis pela extinção de fluorescência das sondas.

A menor eficácia de extinção de fluorescência verificada no HyTy, HyTy-C2 e HyTy-C4 é explicada pelo facto destas moléculas serem as que possuem uma cadeia carbonada menor e consequentemente são mais hidrofílicas o que se traduz em dificuldades de interação com a membrana e neste caso dificuldade em interagir com o TMA-DPH e com o DPH, levando a menores valores de extinção de fluorescência. Podemos ainda ver que o éster HyTy-C8 foi o que provocou maior extinção da fluorescência na sonda DPH, sendo que após este máximo os valores decrescem para os antioxidantes mais hidrofóbicos (C12-C16), observando-se uma ordem de maior a menor extinção da fluorescência de  $C8 > C12 > C6 > C16 > C4 > C2 > \text{HyTy}$ . Estes resultados indicam que a extinção da fluorescência da sonda em presença de antioxidante não se correlaciona com a hidrofobicidade do mesmo, sendo obtida uma variação de tipo parabólico (efeito “*cut-off*”). Esta observação pode ser uma clara manifestação da importância do conhecimento da localização dos antioxidantes nos sistemas miméticos para aumentar a eficácia antioxidante na inibição dos processos resultantes do *stress* oxidativo.

Resultados idênticos são observados para a sonda TMA-DPH ainda que as variações obtidas não sejam tão nítidas uma vez que o HyTy-C16 apresenta um valor anómalo para a variação da extinção da fluorescência, sendo este muito similar com o do éster HyTy-C8.

De forma a perceber o porquê da diminuição da extinção da fluorescência a partir do éster C12, procedeu-se à caracterização da solução após estudo da cinética através da espectroscopia de correlação fotónica (DLS) medindo o diâmetro dos lipossomas, assim como o seu índice de polidispersão, tabela 4-5.



Tabela 4-6: Caracterização das soluções de DMPC c/DPH ou TMA-DPH (1mM) com os ésteres HyTy-C12 (100  $\mu$ M) e HyTy-C16 (100 $\mu$ M) após estudo da extinção da fluorescência por espectroscopia de correlação fotônica (DLS).

Solução	Z-average (nm)	Índice de polidispersão, PDI
DMPC c/DPH 1 mM	115,9 $\pm$ 2,4	0,076 $\pm$ 0,010
DMPC c/DPH 1 mM + HyTy-C12 100 $\mu$ M	118,7 $\pm$ 2,8	0,105 $\pm$ 0,009
DMPC c/DPH 1 mM + HyTy-C16 100 $\mu$ M	143,0 $\pm$ 9,2	0,240 $\pm$ 0,038
DMPC c/TMA-DPH 1 mM	112,0 $\pm$ 5,9	0,050 $\pm$ 0,022
DMPC c/TMA-DPH 1 mM + HyTy-C12 100 $\mu$ M	121,4 $\pm$ 9,1	0,097 $\pm$ 0,020
DMPC c/TMA-DPH 1 mM + HyTy-C16 100 $\mu$ M	135,1 $\pm$ 6,9	0,222 $\pm$ 0,051

Podemos verificar pela tabela 4-5, que os ésteres C12 e C16 apresentam valores de tamanho médio maiores assim como os do índice de polidispersão, podendo-se concluir que poderá ocorrer mudanças induzidas pelos antioxidantes, aquando a sua penetração, nas propriedades da bicamada lipídica, tais como, alteração da espessura da bicamada, alterações na separação de fases e mudanças na elasticidade de curvatura da bicamada.

#### 4.4.2.2. Extinção de fluorescência no ácido protocatecuico

Para o ácido protocatecuico e seus ésteres, estão representados na figura 4-12, os perfis de extinção de fluorescência do DPH na presença do PCA e seus ésteres alquílicos, em lipossomas de DMPC. Estes valores foram obtidos pela diferença entre os valores de extinção de fluorescência da suspensão lipossômica sem antioxidante e os valores de extinção de fluorescência ao fim de 15 minutos de incubação do antioxidante nos lipossomas.

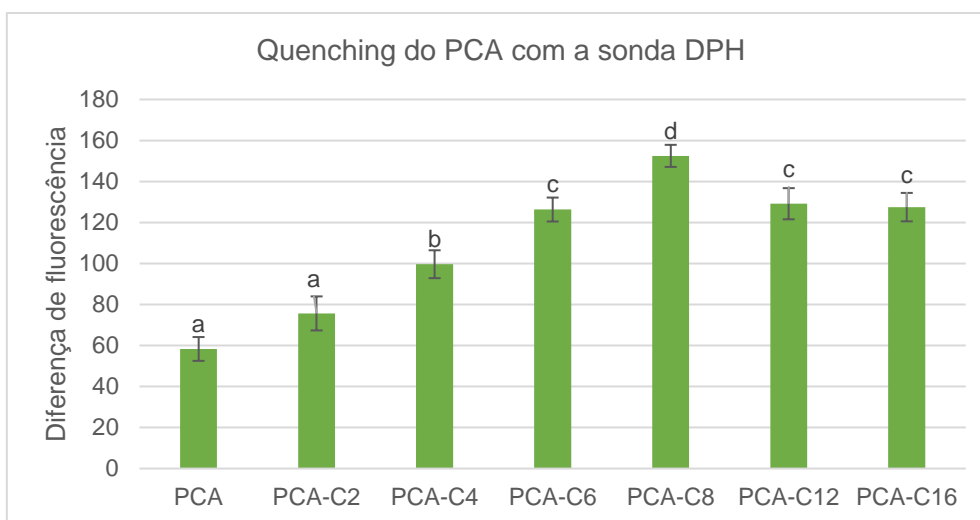


Figura 4-12: Valores da variação de fluorescência da sonda DPH incorporada em lipossomas de DMPC (1mM) numa proporção sonda/lípido de 1:300 e após adição de antioxidante (100  $\mu$ M), a 37° C. (barras de erro representam o erro padrão; letras iguais correspondem a valores estatisticamente iguais).

Ao analisar a figura 4-12 podemos observar que ocorre extinção da fluorescência em todos os compostos. A lipofilicidade influenciou os valores de extinção de fluorescência, ou seja, com o aumento da cadeia carbonada ocorre um aumento dos valores de extinção até a um ponto crítico (PCA-C8), após o qual diminui a extinção de fluorescência (efeito “*cut-off*”).

Os ésteres HyTy-C2 e HyTy-C4 apresentam menores valores comparando com os derivados mais hidrofóbicos pelo facto destes ésteres serem os que possuem uma cadeia carbonada menor e consequentemente são mais hidrofílicos o que se traduz em dificuldades de interação e penetração na membrana.

Os ésteres de cadeia longa (C6-C16) são os que apresentam valores de extinção mais elevados comparativamente com os derivados hidrofílicos (C2-C4), o que indica que penetram melhor na membrana devido à sua maior hidrofobicidade, interagindo assim melhor com a sonda.

A diminuição na extinção da fluorescência observada para os ésteres PCA-C12 e PCA-C16 poderá ser devido a alterações na capacidade de auto-agregação dos derivados de cadeia longa com possível formação de micelas que diminui a disponibilidade dos compostos. Além disso, também poderá ocorrer mudanças induzidas pelos antioxidantes, aquando a sua penetração, nas propriedades da bicamada lipídica. Estas variações podem ser explicadas através do efeito “*cut-off*”, uma vez que após atingir um máximo, ocorre uma diminuição da sua atividade. Apesar de tudo, estas hipóteses ainda não foram comprovadas.

Diversos estudos<sup>[29]</sup> expõem os efeitos da lipofilização de antioxidantes sobre a sua eficácia antioxidante em diferentes sistemas, encontrando um comportamento semelhante ao das figuras 4-10, 4-11 e 4-12. Os resultados obtidos por eles sugerem que é necessário pelo menos quatro átomos de carbono na cadeia alquílica dos antioxidantes, ou seja, antioxidantes de hidrofobicidade intermédia, para se obter hidrofobicidade suficiente para uma penetração mais eficiente na camada lipossomal e consequentemente uma maior interação com as sondas.

## **CAPITULO 5: CONCLUSÕES**

## 5. CONCLUSÕES

Procedeu-se à síntese de ésteres do hidroxitirosol e do ácido protocatecuico com diferentes tamanhos da cadeia alquílica que permitiu o aumento da hidrofobicidade dos antioxidantes estudados. Os rendimentos obtidos situam-se entre 39% e 74% e entre 13% e 35% para os ésteres do hidroxitirosol e do ácido protocatecuico, respetivamente.

Os ésteres do hidroxitirosol foram sujeitos a um estudo de estabilidade por UV-Vis, com exceção dos ésteres C12 e C16. Verificou-se que ao fim de 60 minutos ocorre uma alteração de cerca de 2% nos valores de absorvância, possivelmente devido à oxidação dos compostos a pH fisiológico. No entanto, o período de tempo necessário para fazer o estudo da localização de antioxidantes é de 15 minutos pelo que podemos considerar o HyTy e os ésteres estáveis obtendo assim resultados precisos e fidedignos.

Os ésteres sintetizados foram utilizados para posterior estudo da localização de antioxidantes em lipossomas através de dois métodos de fluorescência, a anisotropia e a extinção de fluorescência. No método da anisotropia foram só estudados os ésteres do hidroxitirosol e o hidroxitirosol com ambas as sondas. No método da extinção da fluorescência foram estudados os ésteres de hidroxitirosol e o hidroxitirosol com ambas as sondas, e os ésteres do ácido protocatecuico assim como o ácido protocatecuico mas só com a sonda DPH.

No estudo da anisotropia podemos concluir que ocorre a interação dos antioxidantes com a membrana utilizando as sondas DPH e TMA-DPH, sendo que o HyTy é o que apresenta valores de anisotropia mais baixos, o que indica que é o que menos interage com a membrana e consequentemente com as sondas, possivelmente devido ao seu elevado carácter hidrofílico. À medida que se aumenta o número de carbonos nas cadeias alquílicas, verifica-se um aumento dos valores de anisotropia em ambas as sondas. Este aumento de anisotropia significa que todos os esteres testados interagem com a bicamada fosfolipídica tanto a nível das cabeças hidrofílicas como das caudas hidrofóbicas.

Nos perfis de extinção de fluorescência do HyTy e seus ésteres com as sondas DPH e TMA-DPH, assim como nos perfis de extinção de fluorescência do PCA e seus ésteres com a sonda DPH é possível verificar que todos os antioxidantes em estudo causaram extinção da fluorescência.

A menor eficácia de extinção de fluorescência verificada no HyTy e no PCA, assim como nos ésteres HyTy-C2, HyTy-C4, PCA-C2 e PCA-C4 é explicada pelo facto destas moléculas serem as que possuem uma cadeia carbonada menor e consequentemente são menos hidrofóbicas o que se traduz em dificuldades de

interação com a membrana e consequentemente com as sondas. Podemos ainda ver que os ésteres HyTy-C8 e PCA-C8 foram o que provocaram maior extinção da fluorescência na sonda DPH, sendo que após estes máximos os valores decrescem, seguindo a ordem  $C8 > C12 > C6 > C16 > C4 > C2 > \text{HyTy}$  para o HyTy e seus ésteres e  $C8 > C12 \approx C16 \approx C6 > C4 > C2 > \text{PCA}$  para o PCA e seus ésteres (efeito “*cut-off*”).

Podemos assim concluir que o aumento da cadeia alquílica altera a estrutura química do antioxidante tornando-o mais hidrofóbico e consequentemente, melhora a penetração dos compostos para o interior da membrana até uma hidrofobicidade intermédia. No entanto, a partir de uma determinada hidrofobicidade esta interação com a bicamada lipídica, parece afetar a integridade dos lipossomas levando a que, erradamente, se julgue que existe uma menor interação com a membrana devido à diminuição dos valores de extinção de fluorescência observados para os derivados mais lipofílicos. Esta alteração da integridade da membrana poderá estar na base de efeitos tóxicos observados em sistemas biológicos, com a consequente observação do efeito “*cut-off*”.

Estes conhecimentos poderão ser importantes para perceber melhor de que forma o aumento da cadeia alquílica nos antioxidantes influencia na sua localização nas membranas lipídicas, sendo que a localização de antioxidantes é um fator muito importante uma vez que muitas das reações de oxidação em células ocorrem ao nível dos ácidos gordos da membrana. Deste modo, a localização do antioxidante junto destes ácidos poderá ser benéfico para a defesa antioxidante.

## **CAPITULO 6: REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- [1] Paiva-Martins, F., Silva, A., Almeida, V., Cravalheira, M., Serra, C., Rodrigues-Borges, J.E., Fernandes, J., Belo, L., Santos-Silva, A., *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **61**, 6636 (2013)
- [2] Paiva-Martins, F., Fernandes, J., Santos, V., Silva, L., Borges, F., Rocha, S., Belo, L., Santos-Silva, A., *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **58**, 135 (2010)
- [3] Gaspar, A., Martins, M., Silva, P., Garrido, E.M., Garrido, J., Firuzi, O., Miri, R., Saso, L., Borges, F., *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **58**, 11273 (2010)
- [4] Figueroa-Espinoza, M.C., Laguerre, M., Villeneuve, P., Lecomte, J., *Lipid Technology* **25**, 131 (2013)
- [5] Gramza, A., Korczak, J., *Trends in Food Science & Technology* **16**, 351 (2005)
- [6] Saija, A., Trombetta, D., Tomaino, A., Cascio, R.L., Princi, P., Uccella, N., Bonina, F., Castelli, F., *International Journal of Pharmaceutics* **166**, 123 (1998)
- [7] Durand, E., Baysary, C., Laguerre, M., Barouh, N., Lecomte, J., Durand, T., Balas, L., Wrutniak-Cabello, C., Cabello, G., Villeneuve, P., *European Journal of Lipid Science and Technology* **117**, 1159 (2015)
- [8] Ferreira, H., Utilização de lipossomas como modelos de biomembranas na avaliação e quantificação da atividade de anti-inflamatórios. Tese de doutoramento, Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, 2006
- [9] Sousa, I., Interação da enrofloxacin com modelos biomembranares: influência das suas propriedades físico-químicas, Tese de Mestrado do Curso de Mestrado em Tecnologia, Ciência e Segurança Alimentar, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, 2007
- [10] Palmeira, T., Interação de uma série homóloga de anfífilas fluorescentes com bicamadas lipídicas na fase líquido ordenado, Tese de Mestrado do Curso de Mestrado em Química, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, 2012
- [11] Slavic, J., *Fluorescent probes in cellular and molecular biology*, CRC Press, Prague, Czech Republic (1994)
- [12] Lakowicz, J. R., *Principles of fluorescence spectroscopy*, Second edition, Keuwer Academic/Plenum Publishers, New York (1999)
- [13] Almeida, J., Losada-Barreiro, S., Costa, M., Paiva-Martins, F., Bravo-Díaz, C., Romsted, L.S., *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **64**, 5274 (2016)
- [14] Blatt, E., Sawyer, W.H., *Biochimica et Biophysica Acta*, Acta 822, 43 (1985)
- [15] Sikaris, K.A., Sawyer, W.H., *Biochemical Pharmacology* **31**, 2625 (1982)
- [16] Costa, M., Determinação quantitativa da distribuição de antioxidantes em emulsões óleo/água e correlação com a sua capacidade antioxidante. Tese de Mestrado do Curso de Mestrado em Química, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, 2012
- [17] Lasic, D.D., *Liposomes: from physics to applications*, Elsevier, Amsterdam (1993)



- [18] Reis, B., Martins, M., Barreto, B., Milhazes, N., Garrido, E.M., Silva, P., Garrido, J., Borges, F., *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **58**, 6986 (2010)
- [19] Lisete-Torres, P., Losada-Barreiro, S., Albuquerque, H., Sánchez-Paz, V., Paiva-Martins, F., Bravo-Díaz, C., *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **60**, 7318 (2012)
- [20] Rodrigues, V., Caracterização estrutural e citotóxica de compostos polifenólicos do azeite. Tese de Mestrado do Curso de Mestrado em Química, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, 2008
- [21] Oliveira, R., Estudo comparativo do potencial anti-inflamatório e antioxidante da cianidina-3-glucósido e do ácido protocatecuico em células intestinais. Tese de Mestrado do Curso de Mestrado em Bioquímica, Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, 2014
- [22] Santos, N. O., Castanho, M. A. R. B., *Química Nova* **25**, 1181 (2002)
- [23] Jones, M. N., Chapman, D., *Micelles, monolayers and biomembranes*, Wiley-Liss Inc., New York (1995)
- [24] Ingólfsson, H.I., Andersen, O.S., *Biophysical Journal* **101**, 847 (2011)
- [25] Costa, M., Losada-Barreiro, S., Paiva-Martins, F., Bravo-Díaz, C., Romsted, L.S., *Food Chemistry* **175**, 233 (2015)
- [26] Losada-Barreiro, S.; Bravo Díaz, C.; Paiva Martins, F.; Romsted, L. S., *Journal Agricultural and Food Chemistry* **61**, 6533 (2013)
- [27] Laguerre, M., Bayrasy, C., Lecomte, J., Chabi, B., Decker, E.A., Wrutniak-Cabello, C., Cabello, G., Villeneuve, P., *Biochimie* **95**, 20 (2013)
- [28] Medina, I., Lois, S., Alcántara, D., Lucas, L., Morales, J.C., *Journal Agricultural and Food Chemistry* **57**, 9773 (2009)
- [29] Panya, A., Laguerre, M., Lecomte, J., Villeneuve, P., Weiss, J., McClements, D.J., Decker, E.A., *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **58**, 5679 (2010)